

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Zoologie



Bc. Simona Krausová

Ptačí malárie vlaštovky obecné
Avian malaria in the Swallow

Diplomová práce

Školitel: doc. Mgr. Pavel Munclinger, Ph.D.

Konzultant: doc. Mgr. Tomáš Albrecht, Ph.D.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14. 8. 2015

Podpis

Poděkování

Poděkování patří především Pavlu Munclingerovi za jeho trpělivé vedení, ochotu a poskytnuté cenné rady, které mi udělil během psaní této práce a v průběhu celého projektu. Dále bych chtěla poděkovat Petru Synkovi za zasvěcení do laboratorních technik a počítačových programů. V neposlední řadě děkuji svému konzultantu Tomáši Albrechtovi a Romaně Michálkové za poskytnutí vzorků a potřebných dat. Za poskytnuté vzorky děkuji i Rebecce Safran.

Poděkování patří také mé rodině, která mě během celého studia ochotně podporovala.

Obsah

Abstrakt.....	6
Abstract.....	7
1 Úvod a cíle práce	8
1.1 Úvod.....	8
1.2 Cíle práce	10
2 Literární přehled	11
2.1 Ptačí migrace	11
2.1.1 Migrační rozhraní	13
2.1.2 Metody výzkumu migrace	14
2.2 Ptačí malárie a jejich biologie	16
2.2.1 Životní cyklus parazitů rodu <i>Haemoproteus</i>	19
2.2.2 Životní cyklus parazitů rodu <i>Plasmodium</i>	20
2.2.3 Vztah mezi fyzickou kondicí ptačího hostitele a maláriemi	21
2.2.4 Vztah mezi pohlavním výběrem a maláriemi	21
2.3 Studovaný druh – vlaštovka obecná - <i>Hirundo rustica</i> (Linnaeus, 1758)	23
2.4 Pohlavní výběr u vlaštovky obecné.....	26
3 Materiál a metodika	28
3.1 Výzkumné lokality a vzorky	28
3.2 Metodika – laboratorní metody	30
3.2.1 Molekulární detekce parazitických linií – nested PCR.....	30
3.2.2 Bioinformatické přístupy: editace sekvencí a databáze	32
3.2.3 Statistické metody a další výpočty.....	33
4 Výsledky.....	35
4.1 Prevalence	35
4.1.1 Celková prevalence na lokalitách	35
4.2 Detekce genetických linií, smíšené linie	36
4.2.1 Nové linie.....	36
4.2.2 Linie rodu <i>Haemoproteus</i>	37
4.2.3 Linie rodu <i>Plasmodium</i>	38
4.2.4 Prevalence v různých letech	39
4.2.5 Smíšené infekce	39
4.3 Linie vlaštovky obecné na lokalitách	40
4.3.1 Linie vlaštovky obecné vůči migračnímu rozhraní.....	40
4.3.2 Linie vlaštovky obecné v Severní Americe	43

4.3.3	Linie vlaštoky obecné na jednotlivých lokalitách v České republice	44
4.4	Median-joining Network	47
4.5	Pravděpodobné lokality přenosu malárií	51
4.6	Vliv malárií na kondici, fitness a sekundární pohlavní znaky u vlaštok	51
5	Diskuze	53
5.1	Prevalence	53
5.2	Detekce genetických linií, smíšené linie	54
5.2.1	Diverzita linií u vlaštoky obecné	54
5.2.2	Linie vlaštoky obecné v Severní Americe	54
5.2.3	Nové linie	55
5.3	Linie vlaštoky obecné na lokalitách	55
5.3.1	Linie vlaštoky obecné vůči migračnímu rozhraní	55
5.3.2	Prevalence a parazitické linie v různých letech na lokalitách v Čechách	56
5.4	Vliv malárií na kondici, fitness a sekundární pohlavní znaky u vlaštok	57
6	Závěr	59
7	Literatura	61
8	Přílohy	74

Abstrakt

Ptáci migrující na dlouhé vzdálenosti se mohou setkat se širokým spektrem parazitů. V rámci jednoho druhu různé populace často využívají různé migrační trasy a mohou i zimovat na odlišných lokalitách. Lze předpokládat, že jedinci využívající různé migrační cesty by měli být nakaženi odlišnými parazity. Pro studium vztahu migrace a distribuce parazitů jsme zvolili kosmopolitně rozšířenou vlaštovku obecnou (*Hirundo rustica*) a ptačí malárie. Vlaštovky migrují na dlouhé vzdálenosti různými migračními směry a některé populace u nich nemigrují vůbec, jsou residentní. Vlaštovka je proto vhodným modelovým druhem pro zodpovězení otázek, zda jsou populace využívající různé migrační cesty nakaženy odlišnými parazity a zda je u populací migrujících na velké vzdálenosti větší diverzita parazitů než u populací residentních. Malarické linie rodu *Plasmodium* a *Haemoproteus* byly detekovány za pomoci nested PCR a sekvenování. Analýzováno bylo 1242 vzorků z 8 různých lokalit z USA, Evropy a Asie. Detekovali jsme 24 různých linií malárií. Z 16 linií patřících do rodu *Plasmodium* byly 4 linie nové a z 6 linií patřících do rodu *Haemoproteus* byly nové 3 linie. Prevalence byly nízké (většinou do 20 %) u všech populací. Residentní populace byly zcela bez nákaz. Vlaštovky z USA byly infikovány unikátními liniemi, které se nevyskytovaly v jiných populacích. Odlišné linie jsme našli u populací z východní a západní Evropy, což odpovídá známým odlišným tahovým cestám. Většina linií detekovaných v Evropě byla zachycena i ve velkém počtu vzorků v ČR, což odpovídá tahovému rozhraní procházejícímu naším územím. U populace z ČR byl navíc testován vliv malárií na kondici, fitness a sekundární pohlavní znaky. Prostřednictvím malárií by totiž mohlo docházet k ovlivnění reprodukčního úspěchu nakažených jedinců. Žádný signifikantní vliv nebyl v naší studii na tyto znaky prokázán.

Klíčová slova: vlaštovka, malárie, migrační rozhraní, migrace, reprodukční úspěch

Abstract

Long-distance migratory birds can encounter a wide range of parasites. Various populations of birds within one species use different migration routes and can also winter in different places. It can be supposed that birds which use different migration routes should be infected with different parasites. To study the relationship between the migration and the distribution of parasites we chose the worldwide species barn swallow (*Hirundo rustica*) and the avian malaria parasites. Swallows migrate long distances in different migrating routes. Some populations of swallows do not migrate, they are resident. This is the reason why swallow is a good model species for finding the answers to questions whether the populations using different migration routes are infected with different parasites or not and whether or not the diversity of parasites is wider in populations which migrate long distances in comparison with the resident populations. The malaria lineages of the genus *Plasmodium* and *Haemoproteus* were detected using nested PCR and sequencing. 1242 samples from 8 different localities from the USA, Europe and Asia were tested. We detected 24 different malaria lineages. Within the genus *Plasmodium* 4 of 16 lines were detected for the first time and in the genus *Haemoproteus* 3 of 6 lines were detected for the first time. The prevalence was low in all tested populations (usually not higher than 20 %). No malaria was found in resident populations. Swallows from the USA were infected with unique lineages, which did not occur in other populations. We found different lineages in populations from the eastern and western Europe, which is in agreement with the different migration routes of these populations. Most of the lineages detected in Europe were also detected in many blood samples of birds from the Czech Republic, which corresponds with the migratory divide that leads across our region. In the population from the Czech Republic the influence of malaria on the condition, fitness and secondary sexual characters was also tested. We suppose that the reproductive success could be influenced by malaria parasites. In our studies no significant effect on these characters was found.

Keywords: barn swallow, malaria, migration divide, migration, reproductive success

1 Úvod a cíle práce

1.1 Úvod

Ptačí malárie je souhrnné označení pro celosvětově rozšířené intracelulární parazity rodů *Haemoproteus*, *Plasmodium* a *Leucocytozoon*. Jedná se o parazity napadající krevní buňky a vnitřní orgány svých obratlovčích hostitelů a k jejich přenosu dochází prostřednictvím vektorů, hmyzu. Prostřednictvím mnoha studií byl prokázán jejich negativní dopad na fitness hostitelů (například vysoká úmrtnost, horší tělesná kondice nebo nižší reprodukční úspěch) a vliv mohou mít i na pohlavní výběr. Z těchto důvodů bývají malárie často využívány jako modelové organismy pro výzkum interakce hostitel-parazit v evolučních a populačně-ekologických studiích.

Do nedávné doby bylo možné studovat malárie pouze pomocí mikroskopických metod. S rozvojem a zdokonalením PCR metod se ale jejich detekce velice usnadnila a zpřesnila. Molekulární studie z poslední doby ukazují velikou diverzitu genetických linií a značné rozdíly v hostitelské specifitě.

V poslední době se objevilo několik málo studií zkoumajících vztah migrační konektivity hostitelů a výskyt parazitů. Některé druhy ptáků migrují každoročně na dlouhé vzdálenosti na svá zimoviště. Pro migraci využívají různé trasy a i v rámci druhu mohou zimovat na zcela odlišných lokalitách. U některých druhů můžeme najít i populace, které migrační tah vůbec nepodstupují, jsou residentní. K nákazám maláriemi může docházet na zimovištích, hnízdištích i při samotné migraci. Lze tedy předpokládat, že různé druhy migrujících ptáků by mohly být nakaženy odlišnými liniemi malarických parazitů. Dále je možné očekávat, že tažné populace by měly vykazovat větší diverzitu těchto parazitů. Malárie mohou hrát důležitou roli také při kolonizačních procesech. Druh, který se šíří na nová území, si s sebou nese i své parazity. Měl by tak být zvýhodněn oproti původním druhům na daném území, u kterých nedošlo ke vzájemné koevoluci a příchod nového patogenu pro ně může mít dalekosáhlé důsledky. Na druhou stranu úspěšnost kolonizujícího druhu na novém území může být zapříčiněna i tím, že se šíří bez svých původních parazitů (Marzal et al, 2011).

Většina dosavadních výzkumů zabývajících se studiem vztahu mezi maláriemi a migrací neprokázala žádnou, nebo jen velice omezenou strukturovanost těchto parazitů ve spojitosti se strukturou ptačí hostitelské populace. Studie autorů Fallon et al. (2006) zkoumala otázku vztahu malárií a migrace u amerického ptáka lesňáčka modrohřbetého (*Dendroica caerulescens*). Geografická strukturovanost parazitických linií zde nebyla

prokázána. U lesňáčka žlutohrdlého (*Geothlypis trichas*) byly zjištěny rozdíly pouze v prevalenci mezi jednotlivými lokalitami a byla potvrzena velmi malá geografická strukturovanost parazitů (Pagenkopp et al., 2008). U lesňáčka lejskovitého (*Setophaga ruticilla*) byl rozdíl ve složení malarických linií potvrzen, ale jen u jedné malé subpopulace. Tento rozdíl je, podle autorů, způsoben pravděpodobně odlišným zimovištěm těchto ptáků od zbytku populace (Durrant et al., 2008). Vliv migračního rozhraní na distribuci a prevalenci genetických linií malárií byl studován autory Santiago-Alarcon et al. (2011) u pěnice černohlavé (*Sylvia atricapilla*) v Německu. U této populace pěnic došlo k nedávnému ustanovení nového migračního směru. Možná právě proto ani zde nedošlo k potvrzení rozdílů ve složení parazitů napříč migračním rozhraním.

Tato práce se zabývá geografickou distribucí parazitických linií a jejich vlivem na sekundární pohlavní znaky a fitness u vlaštovky obecné (*Hirundo rustica*). Vlaštovky hnízdí po celé palearktické oblasti, včetně Severní Ameriky, a zimují na jižní polokouli, často na oddělených zimovištích. Najdeme u ní ale i populace, které migrační tah nepodstupují vůbec a zůstávají po celý rok na stejném místě, jsou residentní. V České republice a ve střední Evropě se navíc nachází migrační rozhraní. Tažné populace odtud odlétají do subsaharské Afriky na svá zimoviště buďto západním nebo východním směrem. Vlaštovka se proto zdá být vhodným modelovým organismem pro studium migrace a geografické distribuce malárií. Mezinárodní spolupráci s Rebeccou Sarfran (University of Colorado) se nám podařilo shromáždit vzorky z různých lokalit z Evropy, Asie a Ameriky. Mohli jsme tedy otestovat hypotézu o geografické distribuci malárií u ptáků s různými migračními směry. Pro některá srovnání používáme v naší studii výsledky z práce autorů Rönn et al. (2015), kteří se zabývali výzkumem transkontinentální migrační konektivity, prevalencí a diverzitou parazitických linií u vlaštovky obecné v Evropě. Zjistili, že prevalence mezi jednotlivými populacemi ptáků, kteří zimovali na různých lokalitách v Africe, lišila. Naopak diverzita detekovaných malárií se mezi populacemi vlaštovek nelišila.

1.2 Cíle práce

Cílem této diplomové práce je:

1. Zjistit prevalenci a prostorový výskyt jednotlivých malarických linií u vlaštovky obecné.
2. Zjistit, zda mají vlaštovky ze Severní Ameriky své původní parazity přenášené v Evropě, nebo zda u nich došlo k přijetí americké parazitické fauny.
3. Vyhodnotit vliv migračního rozhraní vlaštovky obecné v Evropě na distribuci parazitů.
4. Určit pravděpodobné místo přenosu jednotlivých malarických linií (Afriku, Evropu či Ameriku).
5. Zhodnotit vliv malárií na kvalitu sekundárních pohlavních znaků u samců a na jejich celkovou fitness.

Práce je rozdělena na dvě hlavní části. V první teoretické části (Literární přehled), jsou uvedeny některé informace (o migraci, vliv parazitů na pohlavní výběr atd.) potřebné k porozumění řešené problematiky. Druhá praktická část obsahuje popis použitých metod (Metodika), zjištěné informace (Výsledky) a jejich možné vysvětlení (Diskuze).

2 Literární přehled

2.1 Ptačí migrace

Migrace vznikla již v dávné historii (Alerstam et al., 2003) a je definována jako adaptivní odpověď na sezónně se měnící podmínky dovolující živočichům využívat prostorové rozdíly v sezónní fluktuaci zdrojů (Berthold, 1996). Samotný vznik migračního chování však nebyl dodnes zcela vysvětlen. Schopnost migrovat se vyvinula hned u několika živočišných druhů (u ptáků, plazů, savců a některých bezobratlých) nezávisle na sobě a mnohdy již v jejich dávné minulosti. Migrace se navíc od té doby často měnila, plynule adaptovala nebo opět zanikala (Alerstam et al., 2003).

Samotná ptačí migrace vznikla v dávné ptačí historii. Uvádí se, že mezi hlavní faktory, zodpovědné za rozšíření migračního chování, patří sezonalita klimatu a vnitrodruhová konkurence (Alerstam et al., 2003). Rozvoj ptačích druhů se totiž datuje do období třetihor (James, 2005; Jarvis et al., 2014; Jetz et al., 2014). Podnebí v té době bylo teplejší a vyrovnanější než dnes. K prvnímu významnějšímu ochlazení, které vedlo ke změně ve složení vegetace a ke změně klimatu, došlo v pozdním eocénu a trvalo prakticky celý oligocén (40 – 24 mil. let). Podle jedné z představ, která vychází z těchto poznatků, souvisel vznik a rozvoj migrace s druhy vyskytujícími se na severněji lokalizovaných hnízdištích. Tyto druhy byly nuceny se po změně klimatických podmínek, které nastaly právě v eocénu, na zimu začít přesouvat do teplejších oblastí (Bell, 2000). Opačný názor ale zastává většina soudobých studií. Podle nich migrující druhy vznikly v subtropických nebo tropických oblastech. Z těchto míst se pak ptáci rozšířili do vyšších zeměpisných šířek (Berthold, 1996). Tato představa vychází hlavně z přítomnosti vnitrodruhé konkurence (Berthold, 1996), snaze vyhnout se parazitům a predátorům (Alerstam et al., 2003) a také díky zděděným predispozicím od svých předků (Berthold, 1999).

Dnes již víme, že roli v migračních projevech hraje do velké míry genetika. Na různých druzích ptáků byly provedeny studie, které dokázaly dědičnost migračních tras a dalších důležitých vlastností potřebných k úspěšnému dokončení migrace (Berthold & Pulido, 1994; Berthold, 1996; Helbig, 1996; Able & Belthoff, 1998; Pulido, 2007). Podle molekulárně-fylogenetické studie autorů Outlaw et al. (2003) víme, že se migrace vyvinula u různých linií ptáků značně rychle, a že k tomuto jevu došlo hned několikrát. Autoři Salewski & Bruderer (2007) publikovali ve své studii, že migrace se u ptáků vyvinula jako důsledek selektivního tlaku po náhodných událostech. Druh tak může

případně rychle a snadno reagovat zánikem, vznikem nebo i změnou svého migračního chování, pokud u něj existuje selekční tlak na změnu jeho migrační aktivity a tyto případné změny se u něj nahromadí v dostatečném množství (Pulido et al., 1996; Pulido & Berthold, 2004; Pulido, 2007). Tento tzv. prahový model tedy vychází z předpokladu, že je ptačí populace částečně tažná a její migrační chování je kvantitativně geneticky určováno.

Ptáci z holarktické oblasti migrují celkem třemi migračními systémy (viz Obr.1): První systém se označuje jako nearkticko-neotropický a ptáci v něm migrují ze Severní Ameriky do tropů střední a Jižní Ameriky a naopak. Ve druhém systému, který se nazývá palearkticko-asijský, dochází k migraci mezi asijskými tropy a temperátními oblastmi východní Asie. Posledním systémem je palearkticko-africký migrační systém, v němž dochází k tahu mezi tropickou částí Afriky, Evropou a západní Asií. Migruje zde přibližně 185 druhů ptáků (Rappole & Jones, 2003).



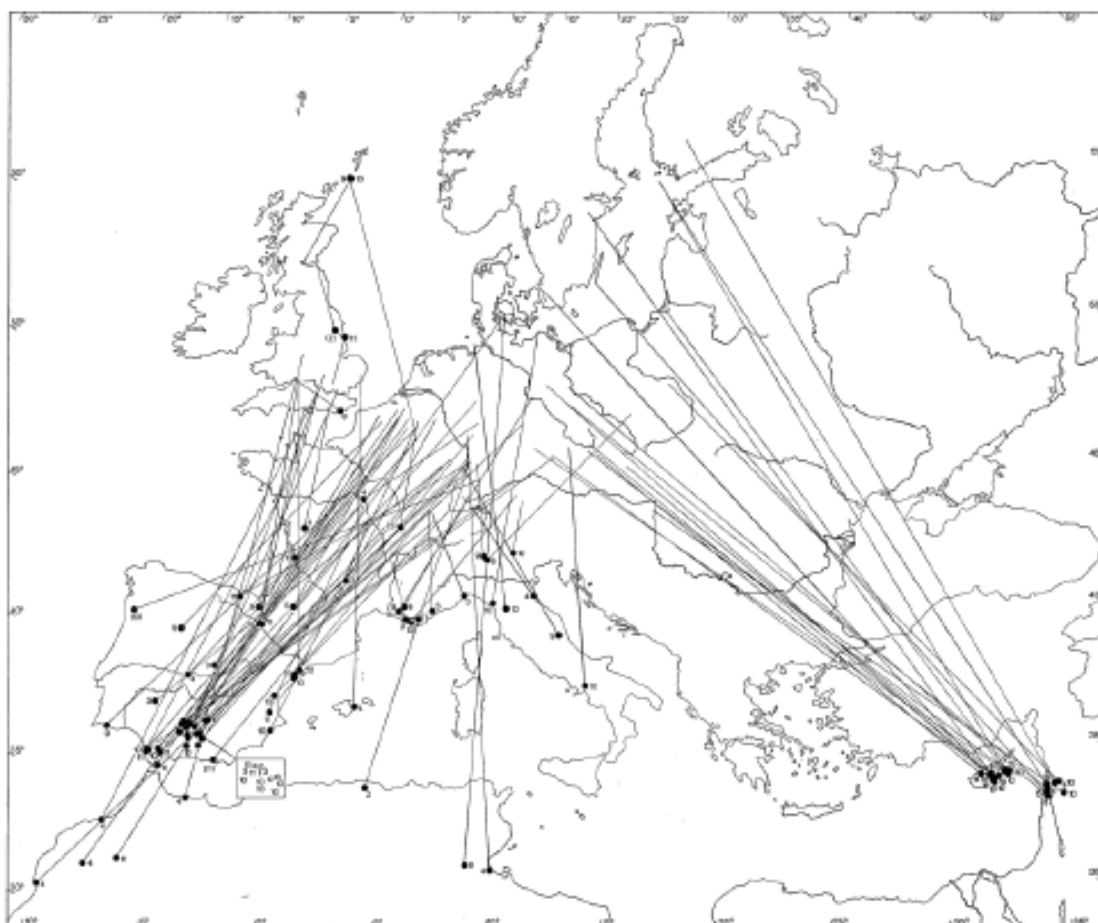
Obr.1: Mapa znázorňující hlavní tahové trasy ptáků v holarktické oblasti. Populace našich ptáků využívají hlavně jihozápadní migrační cestu přes Pyrenejský poloostrov. Zimoviště na indickém subkontinentu využívá z našich druhů pouze lejsek malý (*Ficedula parva*) a hýl rudý (*Carpodacus erythrinus*) (upraveno podle Cepák et al., 2008).

Každý z kontinentů, odkud ptáci na zimu odlétají, má také své významné přírodní překážky. Mezi Severní a Jižní Amerikou se nachází Mexický záliv, který rozděluje migrační trasy severoamerických ptáků na dva směry – přes pevninu a přes moře (Cepák et al., 2008). Ve střední Asii se zase tyčí soutava pohoří včetně Himaláje. Migrující ptáci jsou zde nuceni stočit svoji migrační trasu buď na západní nebo na východní směr a tento vysokohorský komplex obletět. Celé populace jednoho druhu proto volí různé směry letu

a i rozdílná zimoviště. Takto vzniklá separace může vést k postupnému narůstání rozdílů mezi jednotlivými populacemi a k následnému vytvoření nových druhů (Irwin & Irwin, 2005). Evropu od afrických zimovišť odděluje Středozemní moře a poušť Sahara. Ptáci táhnoucí z Evropy do Afriky tedy využívají celkem tři tahové cesty, aby se těmto přírodním překážkám vyhnuli – jihozápadní, jihovýchodní nebo jižní. Třetí směr ale není ptáky tolik využíván hlavně díky přítomnosti Alpského pohoří (Cepák et al., 2008).

2.1.1 Migrační rozhraní

Migrační rozhraní je definováno jako ostrá tahová hranice mezi sousedícími populacemi jednoho druhu, z nichž jedna populace migruje jedním směrem a druhá směrem odlišným (viz Obr.2.). Migrační trasy se zde mohou, ale nemusí, i částečně překrývat (Berthold, 2001).



Obr.2: Příklad migračního rozhraní v Evropě u pěnice černohlavé (*Sylvia atricapilla*). Hnízdiště a zimoviště jsou mezi sebou spojena čarami pro lepší názornost (upraveno podle Møller et al., 2011).

U mnoha ptačích druhů se migrační rozhraní vyskytuje a odděluje existující populace lišící se v migračních vzorech. Podle studie od autorů Møller et al. (2011), kteří provedli analýzu 103 druhů evropských pěvců, se migrační rozhraní vyskytuje až u 26% studovaných druhů. U pěvců s migračním rozhraním se setkáváme s větší disperzí, jejich uražená migrační vzdálenost je delší a rozmanitější jsou i místa jejich hnízdění, než u druhů bez rozhraní. Lišit se mohou dokonce i místa zimovišť (Chamberlain et al., 2000; Rönn et al., 2015). Navíc druhy s migračním rozhraním vykazují různé lokální adaptace a větší diverzitu krevních parazitů. Rozdíly můžeme nalézt i v imunitní odpovědi jednotlivých populací (Møller et al., 2011).

Nejčastěji se uvádí, že migrační rozhraní vzniklo jako důsledek rozšiřování z refugií po glaciálu. Typ migračního rozhraní u většiny evropských pěvců odpovídá post-glaciální expanzi z refugií (Hewitt, 1996, 2000; Møller et al., 2011) a bývá spjato s následnou genetickou diferenciací (Berthold, 2001). Pokud přes migrační rozhraní probíhá pouze omezený genový tok, a to i přes dobré disperzní vlastnosti dálkových migrantů, začne docházet k diverzifikaci jednotlivých populací, což by teoreticky mohlo vést i ke speciaci (Rolshausen et al., 2009; Møller et al., 2011). Příkladem je např. vznik částečné reprodukční bariéry u pěnice černohlavé *Sylvia atricapilla* v Evropě (Rolshausen et al., 2009). Migrační rozhraní nalezneme nejen v Evropě, ale i v Asii a v Severní Americe. Roli ve vývoji migračních rozhraní hrají kromě rozšiřování z refugií i přírodní bariéry, které jsou uvedeny výše (Berthold, 2001).

2.1.2 Metody výzkumu migrace

Migrující jedinci tráví různé období v roce v ekologicky odlišných lokalitách, které spolu neoddělitelně souvisí. O migrační konektivitě většiny ptáků je toho ale zatím známo velice málo. Nejsou známa např. přesná místa zimovišť, nebo zda jedinci z jedné populace létají na stejná zimoviště každý rok a jaké trasy pro migraci využívají (Webster et al., 2002).

V nedávné době došlo k poklesu početnosti populací mnoha ptačích druhů (Donald et al., 2001; De Laet & Summers-Smith, 2007; Smith et al., 2012; Inger et al., 2015). Příčiny této události jsou zatím nejasné. Znalost migrační konektivity (Webster et al., 2002) se tedy jeví být důležitou stránkou pro úspěšnou ochranu migrantů (Ballard et al., 2003), protože pokud neznáme celý životní cyklus druhu, nemůžeme plně porozumět

jeho ekologii a bez možnosti identifikace lokálně-specifických ohrožení nelze ani správně určit příčiny poklesu jeho početnosti (Tankersley & Orvis 2003).

Jednou z nejpoužívanějších metod pro výzkum ptačí migrační konektivity, a zároveň i nejstarší, je kroužkování. Pokud jsou ptáci okroužkováni na svém hnízdišti, a potom odchyceni na zimovišti či během tahu, je možno poměrně dobře zdokumentovat trasu jejich pohybu. Pravděpodobnost zpětných odchytů je ale poměrně malá. Proto se tato metoda používá spíše pro doplnění k jiným metodám (Silleet & Holmes, 2002; Webster et al., 2002).

Další možností studia migrační konektivity je satelitní telemetrie. Jedná se o velmi přesnou a užitečnou metodu. Uplatňuje se hlavně na velkých druzích ptáků, jako je např. orlovec říční (*Pandion Heliaetus*; Martel et al., 2001), čáp černý (*Ciconia nigra*; Chevallier et al., 2011) nebo nesyť americký (*Mycteria americana*; Borkhataria et al., 2013). Pro malé druhy ptáků je ale použití této metody zcela nevhodné. Vysílače, které se využívají, jsou příliš těžké a velké (Webster et al., 2002). Pro sledování migračních cest malých druhů se dnes používají mnohem menší geolokátory (McKinnon et al., 2013).

Využívány pro výzkum ptačí migrační konektivity mohou být i genetické markery. Ptačí populace ale musejí vykazovat určitou fylogeografickou strukturu a diferenciaci. Bez dodržení těchto dvou podmínek bývá tato metoda pro studium migrace neúspěšná. Použity by v tomto případě měly být i rychle se vyvíjející lokusy (Kimura et al., 2002; Lovette et al., 2003).

Velice používanou metodou ve studiu migrační konektivity je v poslední době analýza obsahu stabilních izotopů z tkání migrantů. Analýza se provádí z krve, peří nebo drápů. Ptačí hnízdiště se v mírném pásmu liší svými izotopy od izotopů v tropických oblastech a izotopová stopa je rozdílná i mezi jednotlivými hnízdišti a zimovišti. Pokud ptáci například přepeřují na svých hnízdištích, jejich nová pera by měla nést stopu izotopů z této lokality. Teoreticky tedy lze sběrem a analýzou jejich per po příletu na zimoviště určit místo (hnízdiště) přepeřování jednotlivých ptáků (Rubenstein et al., 2002; Hobson et al., 2004). Problémy ale mohou nastat i zde. Jednak se musí jednotlivé lokality od sebe dostatečně izotopově lišit, a jednak obsah izotopů v tkáních ptáků se může v některých případech rok od roku lišit. K ovlivnění může dojít například složením potravy ptáka nebo i jeho věkem (Graves et al., 2002; Dunn et al., 2006).

Pro zkoumání migrační konektivity může být také využito některých morfologických znaků, specifických pro danou ptačí populaci u jednoho druhu. Spousta

ptačích druhů ovšem tyto morfologické odlišnosti nevykazuje, a proto se tato metoda dá používat jen výjimečně (Webster et al., 2002).

Poslední metodou pro studium ptačí konektivity, kterou zatím nastínilo jen několik málo studií, je výzkum geografické distribuce ptačích parazitů, zejména malárií. Jedná se o krevní parazity skupiny Haemosporidia, kteří jsou přenášeni do svého finálního hostitele krevsajícím hmyzem. Jedná se o kosmopolitně rozšířené parazity (kromě Antarktidy), kteří jsou rozšířeni mezi mnoha ptačími populacemi (Valkiūnas, 2005). Některé linie mohou projevovat vysokou míru specializace na své hostitele a mohou vykazovat pouze omezenou geografickou distribuci. Teoreticky by tedy mohly být, podle některých autorů, využity i ke studiu problematiky migrační konektivity u ptáků (Bensch et al., 2000; Fallon et al., 2005). Kromě toho jednotlivé linie parazitů mohou být rozšířeny i v závislosti na výskytu svých vektorů. Teoreticky tedy lze touto cestou zjistit i některé další, přesnější geografické informace o jejich hostitelích (Webster et al., 2002). I přes všechna pozitiva, která z výše uvedených informací vyplývají, se tato metoda pro výzkum migrace u ptáků zatím moc neuplatnila. A to z několika následujících důvodů. Hlavní nevýhodou jsou především možné rozdíly výsledků mezi jednotlivými druhy ptáků, které mohou být zapříčiněny několika faktory, zejména přítomností či nepřítomností hmyzích vektorů na hnízdištích a zimovištích, schopností mezidruhového přenosu, a nebo přítomností a mírou geografické strukturovanosti jednotlivých parazitických linií (Fallon et al., 2006; Durrant et al., 2008; Pagenkopp et al., 2008). I tak ale lze využít výzkum těchto parazitů ke studiu vztahu parazit–hostitel a zkoumat například otázku, jak migrace ptáků ovlivňuje distribuci svých parazitů. Podobným problémem se zabýváme i v naší studii.

2.2 Ptačí malárie a jejich biologie

Malárie patří mezi intracelulární parazity skupiny Apicomplexa. Napadají krvinky obratlovců - plazů, ptáků i savců (Pérez-Tris et al., 2005; Valkiūnas, 2005) a jejich rozšíření je celosvětové, kromě Antarktidy (Valkiūnas, 2005). Označení „malariční parazit“ je, podle některých autorů, v tomto případě nepřesné. Za malárie se původně označovalo jen onemocnění způsobované rodem *Plasmodium* a ne rodem *Haemoproteus* nebo *Leucocytozoon* (Valkiūnas et al., 2005).

Životní cykly malarických parazitů jsou poněkud komplikované, ale na druhou stranu dobře známé. Během svého vývoje mění parazité hostitele, způsoby rozmnožování

a v různých fázích cyklu i svou morfologií. Potřebují vystřídat 2 hostitele, aby byl cyklus úspěšně dokončen. Definitivním hostitelem je vektor (hmyz z řádu Diptera), který při sání infikuje meziphostitele – obratlovce. Ptačí malárie rodu *Haemoproteus* spp. jsou přenášeny pakomáry (Diptera: Ceratopogonidae) nebo kloši (Diptera: Hippoboscidae). Komáři rodu *Aedes*, *Culex* a *Culiseta* mohou sloužit jako vektorů pro přenos malárií rodu *Plasmodium* spp. a muchničky (Diptera: Simuliidae) mohou být zdrojem nákazy prvoky rodu *Leucocytozoon* spp. (Valkiūnas, 2005).

V tenkém střevu vektora probíhá sexuální fáze a asexuální množení naopak v meziphostiteli. Během sání vektora na hostiteli se společně se slinami dostanou do rány i sporozoiti, kteří se později asexuálně pomnoží v buňkách jednotlivých tkání tohoto meziphostitele. Tato vývojová stádia se označují jako meronti nebo schizonti a v hostiteli se pomnoží merogonií nebo schizogonií na několik generací, během kterých se mu postupně přizpůsobí. Na druhou stranu může ale působením merogonie docházet i ke vzniku zdrojů dalších přidaných infekcí (Valkiūnas, 2005).

V další fázi cyklu dochází k vývoji sexuálních stádií (gametocytů) v erytrocytech. Tato stádia dávají vzniknout gametám – mikrogametám a makrogametám. Gametocyty jsou pro vektora infekční. Po nasátí gametocytů vektorem dojde v jeho tenkém střevě ke gametogenezi, která spustí proces nazývaný oogamie. Hlavními stimuly pro spuštění gametogeneze je změna koncentrace O_2 a CO_2 , ke které dochází při přechodu krve z meziphostitele do vektoru. Během fertilizace dochází ke vzniku zygoty, která se časem změní v podlouhlou a pohyblivou ookinetu. Ookineta pronikne přes peritrofickou membránu a epitelovou tkáň střeva. Zapouzdří se pod bazální laminou střevního epitelu a vznikne z ní oocysta obklopená kapsulí z buněčného materiálu hostitele. Po maturaci oocysty unikají vzniklí sporozoiti do haemocoelu a následně se dostávají do slinných žláz vektora. Sporozoiti jsou infekčními stádii pro obratlovce. Během celého cyklu jsou jednotlivá vývojová stádia malárií haploidní (n). Jediné diploidní stádium ($2n$) je zde stádium zygoty (Valkiūnas, 2005).

Obratlovčí hostitel postupně prochází několika fázemi infekce haemosporidy. K první počáteční fázi, nazývané prepatentní, dochází po kontaktu s vektorem a je charakterizována vývojem parazitů mimo krev hostitele. Pro další fázi, označovanou jako akutní, je typický rychlý nárůst parazitémie (množství infikovaných erytrocytů) a objevení parazitů v krvi. V následující kritické fázi parazitémie dosahuje svého vrcholu. Pokud obratlovec přežije tuto fázi nákazy, která bývá nejkritičtější, vstupuje u něj onemocnění do fáze chronické a posléze do latentní. Chronická fáze je charakteristická

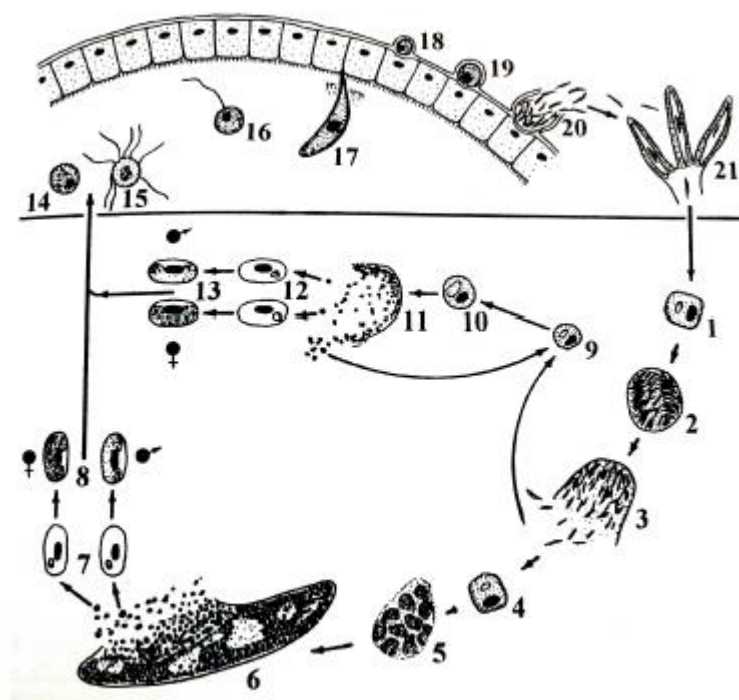
velmi nízkou parazitémií. V latentní fázi se parazité vyskytují jen v endotelu, jaterním parenchymu nebo v jiných tkáních. Z periferní krve již úplně vymizeli a jsou pod kontrolou imunitního systému. U ptáků haemosporida zůstávají v krvi po dlouhou dobu a jednou nakažený jedinec bývá nakažen po mnoho let, většinou až do konce svého života. Takový jedinec taky zůstává zdrojem infekce pro další vektory. Poměrně časté jsou u ptačích haemosporidií relapsy infekcí, které se mohou objevit během hnízdění. Při relapsech dochází k nárůstu parazitémie a může tak docházet i ke zvýšení pravděpodobnosti přenosu infekce do dalších generací (Valkiūnas, 2005).

Dlouho dobu byly ptačí malárie popisovány jen na základě morfologických znaků. S rozvojem molekulárních metod se ale ukázalo, že se mezi takto určenými druhy skrývá ještě mnoho druhů kryptických. Na základě morfologických a fylogenetických dat tedy bylo stanoveno, i když se ještě nestačily mezi těmito druhy vyvinout zřetelnější morfologické rozdíly, že k evolučnímu oddělení druhů je zapotřebí alespoň 5% záměn v genu pro cytochrom b (Hellgren et al., 2007; Valkiūnas et al., 2007). Takto určené (na základě hypotypu genu pro cytochrom b) genetické linie se mohou lišit geografickým výskytem, hostitelskou specifitou, virulencí nebo abundancí.

Míra patogenity, prevalence a diverzity malarických linií v určité ptačí populaci může být ovlivňována mnoha faktory. Jedním takovým faktorem je působení koevoluce. Pokud hostitel a parazit prošli společnou koevolucí, tak by projevy nákazy měly být u hostitelského druhu mírnější (Valkiūnas, 2005), než při proniknutí na nová území (Atkinson et al., 2000). Roli v míře prevalence hraje i výskyt vektorů, který se může lišit napříč jednotlivými lokalitami (Fallon et al., 2006). S rostoucí zeměpisnou šířkou tedy může prevalence stoupat, i když je velká většina parazitických linií rozšířena na poměrně velkém území (Bensch & Akesson, 2003). Dalším důležitým faktorem rozhodujícím o pravděpodobnosti nákazy a diverzitě parazitů je migrace. U migrujících populací totiž stoupá pravděpodobnost nákazy i diverzity parazitů, jelikož jedinci mohou být infikováni nejen na svém hnízdišti, ale i během migrace a na zimovištích (Waldenström et al., 2002; Bensch et al., 2007). Vliv mohou mít i další složky, jako například pohlaví hostitele, jeho stáří, nebo počet a diverzita alel pro geny MHC (Westerdahl et al., 2005).

2.2.1 Životní cyklus parazitů rodu *Haemoproteus*

Reprodukční cyklus (viz Obr.5) těchto parazitů je poměrně komplikovaný a u jednotlivých druhů se může i lišit. Jednotlivá vývojová stadia napadají obvykle svalovou tkáň, slezinu, plíce a jaterní parenchym obratlovců. Většina parazitů tohoto druhu se od sebe odlišuje na základě morfologických rozdílů jednotlivých krevních stádií – gametocytů. Gametocyty napadají erythrocyty a rozložený hemoglobin v nich vytváří tmavá granula, jejichž tvar a počet bývá také druhově specifický. Stadium sporozoita se vyvíjí v endoteliálních buňkách vektora (Valkiūnas, 2005).

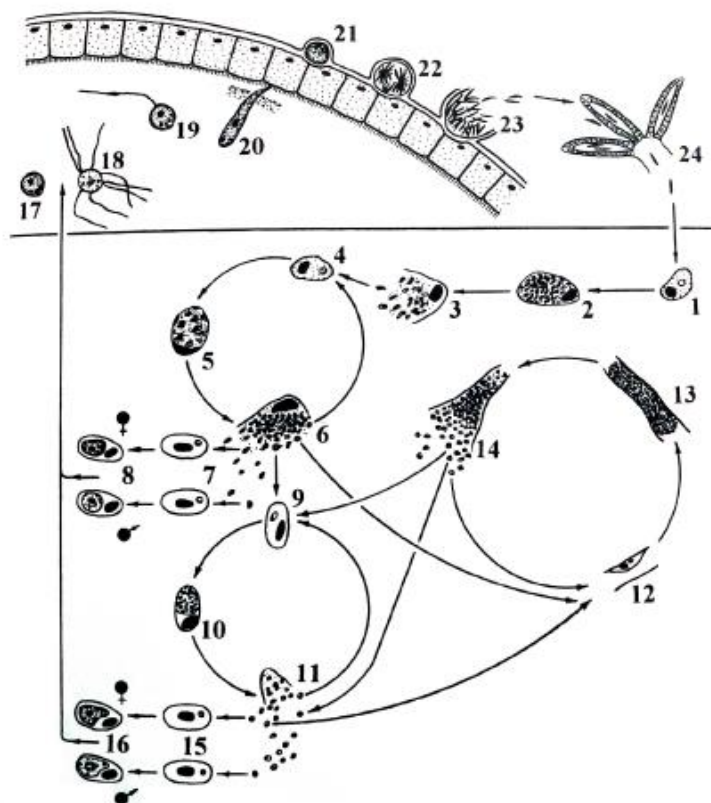


Obr.5: Schematický cyklus rodu *Haemoproteus*, v tomto případě druh *Haemoproteus mansonii*. Horní část – vektor; spodní část – obratlovec; 1 – sporozoit v endoteliální buňce; 2, 3 – meront s merozoity; 4 – merozoit v endoteliální buňce; 5, 6 – megalomeronti ve svalové tkáni; 7 – merozoiti v erythrocytech; 8 - gametocyt; 9 – merozoit v buňce sleziny; 10, 11 - meronti; 12 - merozoiti v erythrocytech; 13 - gametocyty; 14 - makrogameta; 15 – exflagelace mikrogamet; 16 – oplození makrogamety; 17 - ookinet; 18 – oocysta; 19, 20 - sporogonie; 21 – sporozoiti ve slinných žlázách vektora (upraveno podle Valkiūnas, 2005).

Linie rodu *Haemoproteus* jsou obecně méně virulentní a vykazují spíše užší hostitelskou specifitu. Vyvolávají častěji benigní onemocnění, ale některé linie mohou způsobovat i závažnější projevy, jako je například anémie, hlavně u nově napadených druhů (Valkiūnas, 2005; Bensch et al., 2009).

2.2.2 Životní cyklus parazitů rodu *Plasmodium*

Reprodukční cyklus (viz Obr.6) zahrnuje opět několik vývojových stádií (v erythrocytech a hlavně ve slezině). Na parazity rodu *Plasmodium* se zpravidla nahlíží jako na pravé malárie, i když se často morfologie jejich vývojových stádií, hostitelská specifita i životní cyklus dost odlišují. Hlavním určujícím znakem, který splňují všechna Plasmodia, je totiž schopnost vytváření malarického pigmentu a množení se v krevním řečišti (Valkiūnas, 2005; Valkiūnas et al., 2005).



Obr.6: Schematický cyklus rodu *Plasmodium* – zde druh *Plasmodium relatum*. Horní část – vektor; spodní část - obratlovec; 1 – sporozoit v buňce sleziny; 2, 3 - kryptozoit; 4 – merozoit v makrofágu; 5, 6 - metakryptozoiti; 7 – merozoiti v erythrocytech; 8 - gametocyt; 9 – merozoit v erythrocytu; 10, 11 - meronti; 12 – merozoit v endoteliální buňce; 13, 14 - fanerozoiti; 15 – merozoiti v erythrocytech; 16 - gametocyty; 17 - makrogameta; 18 – exflagelace mikrogamet; 19 – oplození makrogamety; 20 - ookinet; 21 - oocysta; 22, 23 - sporogonie; 24 – sporozoiti ve slinných žlázách vektora (upraveno podle Valkiūnas, 2005).

Plasmodia jsou považována za hostitelsky málo specifické a za poměrně invazivní parazity. Linie patřící do tohoto řádu napadají široké spektrum hostitelů, kteří mohou patřit i do jiných řádů. Navíc mívají schopnost rychle měnit hostitele po rozšíření na nová území (Atkinson et al., 2000; Waldenström et al., 2002; Bensch et al., 2009). Kromě toho jejich vliv na obratlovce bývá většinou negativní. Napadení jedinci trpí projevy anémie nebo ucpání cév a následnými ucpáními orgánů v důsledku anoxie (Valkiūnas, 2005)

2.2.3 Vztah mezi fyzickou kondicí ptačího hostitele a maláriemi

Tzv. fitness costs jsou během malarického onemocnění více patrné hlavně během primární infekce. U ptáků účastnících se migračního tahu může docházet k primárním infekcím nejen na hnízdištích, ale také na zimovištích (Bensch et al., 2007). Poměrně často dochází přímo k úmrtím nakažených jedinců ihned v počátku onemocnění (Atkinson et al., 2000; Valkiūnas, 2005; Ferrell et al., 2007; Argilla et al., 2013). K vysoké mortalitě dochází především u imunologicky naivních jedinců nebo u endemických druhů, např. na ostrovech, kde neproběhl dlouhodobější společný evoluční vývoj. Asi nejznámějším případem, který vedl málem k vyhubení celého druhu, jsou havajští ptáci Amakihi (*Hemignathus virens*) podčeledi Drepanidinae (Atkinson et al., 2000).

Pokud ale nakažený jedinec přežije akutní fázi onemocnění, může dále docházet k ovlivňování fitness (Knowles et al., 2010a; Lachish et al., 2011). Nejvýznamnějším projevem bývá destrukce krvinek a následná anémie (Valkiūnas, 2005). Může docházet ke změnám zbarvení a morfologii některých vnitřních orgánů (Atkinson et al., 2000; Valkiūnas, 2005; Ferrell et al., 2007; Palinauskas et al., 2008), ke zvýšení počtu ektoparazitů (Marzal et al., 2008) nebo ke zvýšení rizika predace (Møller & Nielsen, 2007). Dalšími vedlejšími příznaky může být například snížení schopnosti ukládání tělesného tuku (Marzal et al., 2008), který je důležitý pro úspěšnou migraci. Jedinci s většími zásobami tuku mají lepší předpoklady pro úspěšné ukončení migrace, než jedinci s menším množstvím tuku. Nepotřebují tolik zastávek pro doplnění zásob během migrace (Valkiūnas, 2005). Může tak přímo docházet k opoždění přiletu na hnízdiště a poté i k ovlivnění reprodukčních událostí (Waldeström et al., 2002; Votýpka et al., 2003; Saino et al., 2004; Valkiūnas, 2005; Knowles et al., 2010b; Asghar et al., 2011). Podle studie autorů Garvin et al., (2006) k ovlivňování hmotnosti dochází, ale jen během vysoce stresujících událostí, jako je například hnízdění a migrace.

2.2.4 Vztah mezi pohlavním výběrem a maláriemi

Pohlavní výběr hraje důležitou roli ve volbě partnera a jistým způsobem na něm závisí reprodukční úspěch každého jedince. Výběr určitého samce za partnera samicí závisí na konečném výsledku kompetice mezi samci a samičím výběrem. Pomocí pohlavního výběru vznikají také sekundární pohlavní znaky, které se obvykle tvoří u samců. Samci

právě obvykle bojují mezi sebou o pozornost samic. Podle těchto znaků si samice vybírají své partnery (Darwin, 1871).

Podle hypotézy autorů Hamiltona a Zukové (1982) by exprese samčích sekundárních pohlavních znaků také mohla být ovlivňována parazity. Tyto znaky totiž slouží jako tzv. „čestný signál“ a ukazují, zda je jejich majitel nositelem tzv. „dobrých genů“. „Dobré geny“ nesou resistenci vůči parazitům a jiným patogenům a mohou se přenášet na potomstvo. Potomci takového samce tak budou „kvalitnější“ a získají potřebnou resistenci proti malarickým infekcím a dalším patogenům. Obecně se sekundární pohlavní znaky vnímají jako nezfalšovatelný a spolehlivý signál kvality samců, protože jejich exprese je velice energeticky náročná. Samci s kvalitnějšími ornamenty by navíc měli svým potomkům zajišťovat lepší otcovskou péči a zvyšovat i jejich šanci na přežití (Garamszegi, 2005). Samice by si tedy měly vybírat samce na základě kvality těchto znaků.

U ptáků se jako hlavní sekundární pohlavní znak uplatňuje hlavně kvalita zbarvení peří. Samice si vybírají jedince s jasnějšími barvami (Hamilton & Zuk, 1982; MacDougall & Montgomerie, 2003), podle zbarvení peří na prsou (del Cerro et al., 2010), hodnotí ornamenty na čele a křídlech (Szöllösi et al., 2009) a roli hraje i hlasový projev samců (Garamszegi, 2005).

Exprese sekundárních pohlavních znaků může být ovlivňována prostřednictvím parazitů v několika různých směrech. Roli v expresi může hrát například velikost těla, množství tuku, přítomnost endoparazitů a ektoparazitů, velikost teritoria samců, frekvence krmení mláďat (Keyser & Hill, 2000), zpěv samců (Garamszegi, 2005; Bensch et al., 2007), kvalita peří (Møller & Saino, 1994; Szöllösi et al., 2009; Garamszegi & Møller, 2012) a celková fitness jedince (Knowles et al., 2011). Některé z výše uvedených znaků, např. objem hlavy, délka tarsu nebo celková fitness, jsou srovnávány ve vztahu k maláriím i v této studii.

Ačkoliv byl potvrzen negativní vliv malárií na ptačí hostitele, najde si i několik studií, které toto tvrzení vyvrací (Ricklefs et al., 2005; Bensch et al., 2007; Ortego et al., 2008; Szöllösi et al., 2009). Musíme ale vzít v úvahu, že výzkum byl u ptáků prováděn během hnízdění. V této roční době se nakažení jedinci ocitají v chronické části onemocnění, kdy jsou malárie pod kontrolou imunitního systému (Snounou et al., 1989). Nemusí tak docházet k nápadnějším projevům onemocnění jako ve fázi akutní (Marzal et al., 2005; Asghar et al., 2011), ke které u migrujících populací dochází hlavně na zimovištích (Waldenström et al., 2002). Nakažení jedinci zpravidla nebývají tolik aktivní

jako jedinci nenakažení (Valkiūnas, 2005) a jednotlivci s nejvyššími hodnotami parazitémie většinou umírají v počátečních fázích nákazy. Nebývají pak zahrnuti do celkových výsledků studií (Asghar et al., 2012).

2.3 Studovaný druh – vlaštovka obecná - *Hirundo rustica* (Linnaeus, 1758)

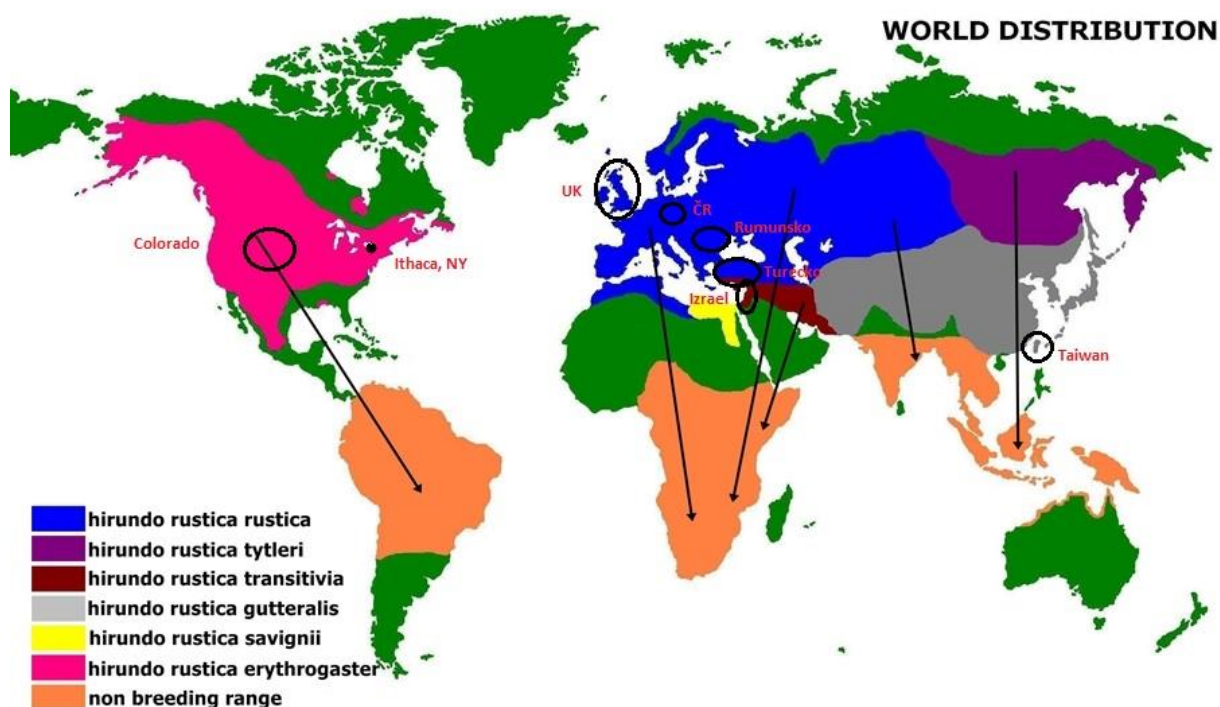
Vlaštovka obecná (*Hirundo rustica*), z čeledi vlaštovkovitých (Hirundinidae), je malý pták s hmotností kolem 20 g v dospělosti, patřící mezi Pěvce - Passerines (Cramp et al., 1988).

Hnízdní areál vlaštovek se nachází v celé Eurasii (s výjimkou nejsevernějších oblastí) a také v Severní Americe (Cepák et al., 2008). Vytváří několik poddruhů (viz Obr.3), které se mezi sebou více či méně liší, např. v barvě opeření (viz Obr.4), oblastí výskytu nebo v migračním chování (Cramp et al., 1988). V Evropě, Malé Asii a na severu západní Afriky (severní Maroko, Alžír a Tunisko) se vykytuje poddruh *H. r. rustica*. Zimoviště ptáků ze západních částí Eurasie se nacházejí v subsaharské Africe, východněji hnízdící populace zimují v jižní a jihovýchodní Asii. Naprostá většina evropské populace vlaštovek zimuje v subsaharské Africe, někteří jedinci i ve Středomoří (Cepák et al., 2008). V Asii nalezneme 2 poddruhy – *H. r. tytleri* vyskytující se od jižní části Sibiře až po sever Mongolska a *H. r. gutturalis*, která obývá jižní a východní část Asie. Populace ptáků těchto dvou poddruhů také migrují na svá zimoviště jižním směrem. Někteří jedinci dosahují až na sever Austrálie. Africký poddruh vlaštovek *H. r. savignii* se vyskytuje pouze v Egyptě a žádný migrační tah nepodstupuje, je zde residentní. Narozdíl od poddruhu *H. r. transitiva*, který hnízdí v Izraeli a patří mezi migranty na kratší vzdálenosti (Cramp et al., 1988). Americký poddruh vlaštovky obecné (*H. r. erythogaster*) obývá téměř celý kontinent Severní Ameriky, kromě arktických oblastí, a zimuje v Jižní Americe. Poměrně nedávno došlo k založení nové stálé populace těchto vlaštovek v Argentině (Martínez, 1983).

Lokace zimovišť populací vlaštovek ze severní Evropy a populací z jižní Evropy se mezi sebou liší. Populace hnízdící ve Velké Británii, Skandinávii a severovýchodní Evropě pravděpodobně přezimují v jižní Africe. Populace vyskytující se ve Švýcarsku, Itálii a Španělsku migrují na hnízdiště nacházející se ve střední a západní Africe. Ve střední Evropě je tedy patrné různé migrační chování jednotlivých populací vlaštovek

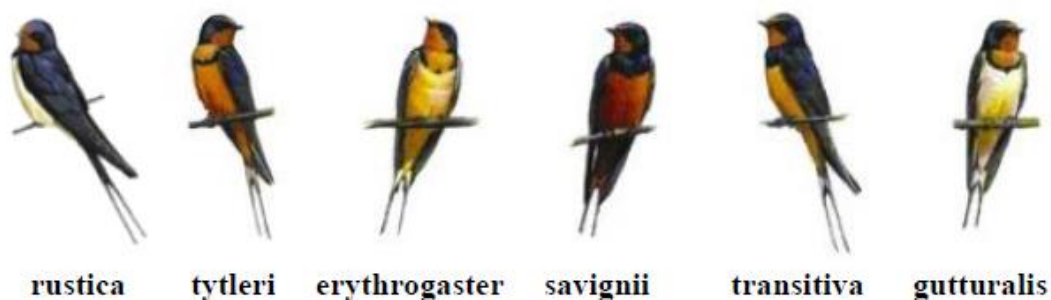
(Ambrosini et al., 2009). Mluvíme tak o existenci migračního rozhraní u vlaštovky obecné (Hobson et al., 2012).

Všech 6 poddruhů vlaštovky tvoří monofyletickou skupinu a jejich divergence spojená s rozsáhlou expanzí proběhla v podstatě nedávno, před 100 000 lety (Zink et al., 2006; Dor et al., 2010). I přesto jsou si některé poddruhy vzájemně příbuznější než jiné. Podle studie Dor et al. (2010), která se zabývala vnitřními vztahy uvnitř čeledě Hirundinidae, tvoří vlaštovky 2 dobře podpořené skupiny. Do první skupiny spadají vlaštovky z Evropy, centrální Asie a oba poddruhy ze Středního východu (*H. r. savignii* a *H. r. transitiva*). Do druhé skupiny patří vlaštovky z Ameriky a 2 asijské poddruhy *H. r. gutturalis* a *H. r. tytleri*. Toto rozdělení na základě molekulárních dat bylo dobře podpořeno i morfologickými znaky (velikostí tmavého ornamentu na prsou). Překvapivě prokázaný sesterský vztah amerického poddruhu *H. r. erythrogaster* a asijského poddruhu *H. r. tytleri* byl potvrzen i ve studii od autorů Zink et al. (2006). Autoři této práce navrhuji pro vysvětlení výše zmíněného faktu hypotézu sekundární disperze vlaštovek ze Severní Ameriky zpět do Asie.



Obr.3: Mapa hnízdního areálu vlaštovky obecné (*Hirundo rustica*) s migračními cestami jednotlivých poddruhů vlaštovky obecné s vyznačenými lokalitami ovzorkovaných populací. (Převzato ze stránky <http://www.barbetbirding.co.za/sub-species-migration>).

Vlaštovka obecná se živí létajícím hmyzem, který loví za letu ve vzduchu. Vyskytuje se v prostředí s vodními zdroji a zelenou vegetací kolem. V dnešní době ji najdeme hlavně na pastvinách v přítomnosti hospodářských zvířat, loukách, farmách, u různých kůlen a přístřešků, kde si staví svá miskovitá hnízda z bláta a dalšího rostlinného materiálu (obvykle 20 cm v průměru, 10 cm hloubka), ve výšce 2 – 5 metrů nad zemí. Hnízdí buď solitérně a nebo v koloniích. Americká vlaštovka *H. r. erythrogaster* hnízdí hlavně v koloniích o obvykle 20 – 40 párech (Cramp et al., 1988). Samci přilétají na hnízdiště o něco dříve než samice (Møller et al., 2003) a začínají stavět hnízdo. Vlaštovky hnízdí obvykle 2x za sezonu a samice je během své fertility intenzivně hlídána svým sociálním partnerem. Velikost snůšky se pohybuje nejčastěji v rozmezí 4 – 5 vajec (Cramp et al., 1988) a vylíhlá mláďata krmí oba rodiče. Po přiletu samic začínají samci se svými namlouvacími rituály, kdy samicím předvádějí své ornamenty (Møller, 1988). Hnízdění u nás trvá asi 4 měsíce, a to od května do srpna.



Obr.4: Jednotlivé poddruhy vlaštovky obecné, které se mezi sebou liší například zbarvením (Převzato a upraveno ze stránky: <http://safranlab.weebly.com/>).

Vlaštovky jsou zbarveny kovově lesklou, černo-modrou barvou na dorzální straně těla a bílou až kovově rezavou barvou opeření na spodní straně těla. Hrdlo a čelo je zbarveno červeně (Cramp et al., 1988). Dříve se myslelo, že toto zbarvení je způsobeno karotenoidy (Saino et al., 1999). Dnes již víme, že v něm hrají roli melaninové pigmenty (McGraw et al., 2004). Samice se od samců liší svým vzhledem jen velmi málo, sexuální dimorfismus je zde velice nenápadný. Samci mívají delší vnější ocasní pera o cca 16% než samice (Møller, 1988).

Ve studii autorů Rönn et al. (2015), kteří se zabývali studiem transkontinentální migrační konektivity a diverzitou parazitických linií u těchto ptáků v Evropě, byly zjištěny zajímavé výsledky. Detekovali celkem 27 linií, včetně rodu *Leucocytozoon*. Do rodu *Plasmodium* patřilo 9 linií a většina z nich byla již známa z jiných druhů ptáků. Do

rodů *Haemoproteus* a *Leucocytozoon* bylo zařazeno taktéž po 9 liniích a většina byla osekvenována poprvé. Prevalence pro jednotlivé rody byla následující: rodem *Plasmodium* bylo nakaženo 12,2% ptáků, rodem *Haemoproteus* 3,8% a nejméně jedinců neslo nákazu způsobenou rodem *Leucocytozoon* (2,4%).

2.4 Pohlavní výběr u vlaštovky obecné

Většina studií poukazuje na vztah mezi délkou rýdovacích per u evropského poddruhu vlaštovky obecné (*Hirundo rustica rustica*) a reprodukčním úspěchem samců (Møller, 1988; Saino et al., 1997; Møller et al., 2003). Samice dávají přednost samcům s nejdelšími ocasními pery a délka ocasu koreluje i mezi daným párem (Møller, 1993b). Při experimentální změně délky ocasních per u samců došlo i ke změně jejich úspěšnosti spárovat se se samicemi (Møller, 1988). Vyšší podíl paternit ve vlastním hnízdě byl detekován u samců s uměle prodlouženým ocasem nebo s přirozeně dlouhým ocasem, oproti samcům z kontrolní skupiny. U samců s experimentálně zkrácenými pery došlo k opačnému případu (Saino et al., 1997). Zdá se, že kromě samotné délky ocasu hraje roli i jejich symetrie. Samice dávají přednost samcům s delšími a symetrickými pery, oproti samcům s pery krátkými a asymetrickými (Møller 1993a; 1993b).

Naopak studie autorů Smith et al. (1991) nepotvrdila, že by k ovlivnění fertilizačního úspěchu u samců došlo po experimentálním prodloužení či zkrácení jejich ocasních per. Fertilizační úspěch zde koreloval s původní délkou per před manipulačním experimentem. Bylo prokázáno, že délka vnějších ocasních per se mění se stářím jedince (Lifjeld et al., 2011). Samci, kteří mají delší rýdovací pera, tedy mohou mít vyšší reprodukční úspěch, jelikož jsou starší (Smith et al., 1991).

S délkou rýdovacích per pozitivně korelují nápadné bílé ornamenty, které se nacházejí na jejich konci, a které jsou větší u dospělců, zvláště u dospělých samců (Kose & Møller, 1999). Patrně hrají roli ve vnitrodruhové vizuální komunikaci a v pohlavním výběru (Kose & Møller, 1999). Udržování těchto bílých ornamentů je poměrně nákladné, protože bývají přednostně vyhledávány ektoparazity (Kose & Møller, 1999). Kvůli náročnosti jejich údržby se označují jako věrohodné signály kvality daného jedince.

Severoamerické vlaštovky (*Hirundo rustica erythrogaster*) mají v porovnání s evropskými vlaštovkami podstatně kratší ocasní pera a jejich ventrální část těla je mnohem barevnější (Cramp, 1988). Také u tohoto poddruhu se vyskytuje pohlavní dimorfismus. Zda ale hraje u tohoto poddruhu roli ve fertilizačním úspěchu u samců také

délka rýdovacích per není zatím uspokojivě objasněno. Podle studie autorů Kleven et al. (2006) fertilizační úspěch pozitivně koreloval s délkou ocasu i u severoamerické populace z Kanady. Avšak většina studií tento vztah nepotvrdila. Hlavním znakem, který ovlivňuje reprodukční úspěch a párování, je zde místo délky ocasních per právě ventrální zbarvení (Safran & McGraw, 2004; Safran et al., 2005; Maguire & Safran, 2010).

Zdá se, že ventrální zbarvení hraje roli v reprodukčním úspěchu i u japonské populace vlaštovek (*Hirundo rustica gutturalis*; Hasegawa et al., 2014). Zde se navíc objevil i pozitivní vztah s bílými vzory na ocasních perech (Hasegawa & Arai, 2013). V případě populace vlaštovek hnízdících v oblasti východního Mediteránu (*Hirundo rustica trasiiva*), u kterých se také vyskytuje pohlavní dimorfismus, byla taktéž zjištěna korelace ventrálního zbarvení s reprodukčním úspěchem, ale roli v tomto případě hrála i délka ocasních per (Vortman et al., 2011).

Studie autorky Michálkové (2012), která se týkala mimopárových paternit a síly pohlavního výběru u vlaštovek, testovala vztah symetrie ocasu a jeho délky s reprodukčním úspěchem u samců u české populace ptáků. Do studie byla zahrnuta další získaná data, jako například velikost bílých ocasních ornamentů, zbarvení peří na hrdle a objem hlavy. V této studii vztah mezi délkou rýdovacích per, jejich symetrie nebo bílých ornamentů s reprodukčním úspěchem nesouvisel. Naopak se zdá, že roli hraje tón zbarvení peří a dokonce i objem hlavy. Dále bylo potvrzeno párování samců a samic na základě délky ocasních per, tzv. asortativní páření.

3 Materiál a metodika

3.1 Výzkumné lokality a vzorky

Vzorky vlaštovek používané v této práci pocházejí ze dvou zdrojů:

1. V roce 2010 – 2013 probíhaly odchyty vlaštovek v jižních Čechách na dvou izolovaných lokalitách v blízkosti CHKO Třeboňsko. První lokalita se nacházela v Lomnici nad Lužnicí – Šaloun (49°4'7.762"N, 14°42'36.521"E) a druhá lokalita v Lužnici (49°3'25.288"N, 14°46'10.82"E) v okrese Jindřichův Hradec. Na obou zmíněných lokalitách se nacházejí izolované zemědělské usedlosti, kde vlaštovky hnízdí, a které umožňují odchyt hnízdicích jedinců. V roce 2013 se odchty rozšířily ještě o lokalitu Obora. Sterilní inzulinovou injekční stříkačkou bylo odebráno malé množství krve (2-25 µl) všem odchyceným jedincům z pravé nebo levé žíly pod křídlem (*vena cutanea ulnaris*). Takto odebraná krev byla uchována v 96% ethanolu při teplotě -20°C. Později byla z těchto vzorků extrahována a purifikována DNA, podle již daného protokolu, za pomoci komerčně dodávaného kitu DNeasy® TissueKit (Qiagen, Hilden, Germany). Dále byli jedinci morfometricky měřeni. Za pomoci digitální váhy (Pesola, MS500, 0-500g, d = 0,1g) byla stanovena hmotnost, měřila se délka pravého a levého krajního ocasního pera, délka křídla a délka tarsu (pravítkem se zarážkou). Dále byly měřeny rozměry hlavy za pomoci digitálního posuvného měřítka pro pozdější výpočet objemu mozku. Každému odchycenému jedinci byl ještě odebrán vzorek peří - 10 a více jednotlivých per bylo opatřeno vytrhnuto z ventrální strany těla (hrdlo, hrud', břicho, podocasní krovky). Vzorky byly měřeny reflektančním spektrofotometrem AvaSpec 2048 za použití světelného zdroje AvaLight-XE light source (Avantes, Nizozemsko). Každý vzorek byl měřen třikrát, a to v distální části pera pod úhlem 90°, za standardizovaného osvětlení. Spektrofotometr byl vždy po změření dvou jedinců kalibrován za použití standardu bílé barvy WS-2 a temné komory. Jednotlivá měření byla v programu AvaSoft 7.8 konvertována s intervalem 1 nm do souhrnné tabulkové verze, která byla dále analyzována v programu R 3.1.2 (R Core Team 2014) za použití balíčku *pavo* (Maia et al. 2013). Spektrální data byla ořezána na oblast vlnových délek od 300 do 700 nm, byly určeny hodnoty reflektance odpovídající vlnovým délkám v celých číslech. Tři měření každého vzorku byly zprůměrovány a získané křivky

byly vyhlazeny (span = 0,25). Pro hodnocení vlivu barevnosti byly spočítány hodnoty z modelu ptačího vidění Tetrahedral Avian Colorspace (*theta*, *phi*, *r-achieved*). Ptačí vizuální model byl zpracován v programu R za použití balíčku pavo. Vzhledem k nejbližší fylogenetické příbuznosti s vlaštovkou byl z daných možností vybrán vizuální systém a citlivost receptorů sýkory modřinky, zadané osvětlení odpovídalo standardnímu dennímu světlu (D65). Získané hodnoty *theta* a *phi* odpovídají tradičnímu viditelnému, resp. UV odstínu, zatímco *r-achieved* vyjadřuje sytost. Tyto vzorky a uvedené údaje, získané během měření, pro naši studii poskytl doc. Mgr. Tomáš Albrecht, Ph.D. a jeho spolupracovníci (Michálková, 2012; Petrželková et al., 2015).

2. Vzorky ze dvou různých států Evropy (UK, Rumunsko), Israele, Turecka, Taiwanu a ze dvou lokalit v Americe (Colorado, Ithaca v New Yorku) nám poskytla Rebecca Safran (University of Colorado). Podařilo se nám tak nashromáždit reprezentativní vzorek pro studium migrační konektivity pomocí malarických parazitů. Počty analyzovaných vzorků v naší studii z jednotlivých lokalit (včetně ČR) ukazuje Tabulka 1.

V této studii pracujeme tedy s celkovým počtem 1242 vzorků vlaštovek z různých míst světa. Z toho však většina vzorků (925) pochází z České republiky.

Pro některá srovnání používáme v naší studii výsledky z práce autorů Rönn et al. (2015), kteří se zabývali výzkumem transkontinentální migrační konektivity, prevalencí a diverzitou parazitických linií u vlaštovky obecné v Evropě.

Druh	Země	Počet vzorků
<i>H. r. erythrogaster</i>	Colorado	144
<i>H. r. erythrogaster</i>	Ithaca (NY)	27
<i>H. r. rustica</i>	UK	21
<i>H. r. rustica</i>	ČR	925
<i>H. r. rustica</i>	Rumunsko	16
<i>H. r. rustica</i>	Turecko	46
<i>H. r. transitiva</i>	Israel	45
<i>H. r. gutturalis</i>	Taiwan	18

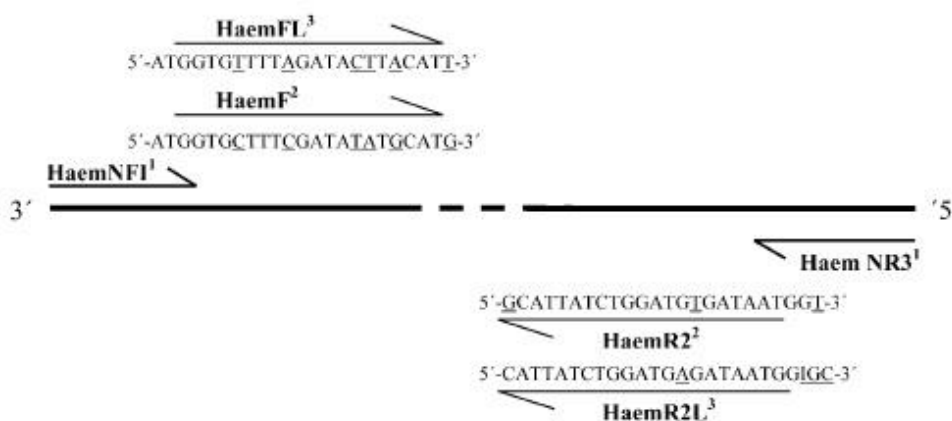
Tabulka 1: Počty vzorků vlaštovek z jednotlivých zemí, které byly v naší studii použity.

3.2 Metodika – laboratorní metody

3.2.1 Molekulární detekce parazitických linií – nested PCR

K detekci malarických parazitů byla použita vysoce citlivá (schopnost zachytit 1 infikovaný erytrocyt na 100 tisíc zdravých erytrocytů) metoda nested PCR, popsaná v protokolu od Hellgren et al. (2004).

Jedná se o dvou krokovou PCR se dvěma sadami speciálně navržených primerů pro zachycení úseku genu cytochromu b, který umožňuje detekci malarických linií rodu *Plasmodium*, *Haemoproteus* a *Leucocytozoon*. V prvním kroku se používá dvojice tzv. vnějších primerů HaemNFI (5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3') (I je univerzální báze iosin) a HaemNR3 (5'-ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3'). V této počáteční fázi PCR amplifikujeme úsek cytochromu b dlouhý 566 bp (včetně primerů) všech třech výše uvedených haemosporidií. Ve druhém kroku použijeme sadu tzv. vnitřních primerů HaemF (5'-ATGGTGCTTTCGATATATGCATG-3') a HaemR2 (5'-GCATTATCTGGATGTGAT AATGGT-3') pro společnou detekci rodů *Haemoproteus* a *Plasmodium* pro amplifikaci 527 bázového úseku (včetně primerů, 480 bp bez primerů). Pro detekci linií rodu *Leucocytozoon* se používají primery HaemFL (5'-ATGGTGTTTTAGATACTTACATT-3') a HaemR2L (5'-CATTATCTGGATGAGATAATGGIGC-3') (viz Obr.7). Získáme tak úsek genu dlouhý 527 bp (včetně primerů, 478 bp bez primerů). V této finální PCR použijeme jako templát produkt počáteční PCR.



Obr.7: Schematické zobrazení kombinací jednotlivých primerů a směru jejich nasedání na templátové vlákno DNA. 1. Primery používané pro počáteční krok nested PCR. 2. Kombinace primerů pro amplifikaci parazitů rodu *Haemoproteus* a *Plasmodium*. 3. Kombinace primerů pro amplifikaci linií rodu *Leucocytozoon*. Primery HaemR2L/R2/NR3 se připojují na templátové vlákno v směru 5'-3'. Podtržené nukleotidy ukazují sekvence, které mezi sebou dvojice primerů HaemF–HaemFL a HaemR2–HaemR2L nesdílí. (upraveno dle Hellgren et al. 2004)

Kvůli nečekaně nízké prevalenci nákaz způsobené parazity z rodu *Leucocytozoon*, která byla detekována ve vzorcích vlaštovek odchycených roku 2010 v jižních Čechách, jsme tento krok (detekci rodu *Leucocytozoon*) z naší studie nakonec zcela vynechali (více viz. Výsledky).

Pro iniciální fázi PCR amplifikace jsme na 1 reakci použili 4 µl neředěné DNA, 5 µl Qiagen Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Německo) a 0,5 µM primerů HaemNR3 a HaemNFI.

Kvůli použití Qiagen Multiplex PCR Master Mix, který obsahoval HotStar *Taq* DNA polymerázu, začínal cyklus inkubací trvající 10 minut při teplotě 94 °C. Následovala denaturace při 94 °C trvající 30 sekund, potom annealing (nasedání primerů) při teplotě 50 °C probíhající 30 sekund, a elongace (syntéza komplementárního řetězce DNA) trvající 45 sekund při 72 °C. Tento cyklus (denaturace, annealing a elongace) se dvakrát opakoval. Po skončení cyklování nastalo udržování teploty 72 °C po dobu 10 minut.

Ve druhém kroku PCR došlo k namíchání potřebné směsi pouze pro reakci potřebnou k amplifikaci parazitů rodu *Haemoproteus* a *Plasmodium*. Krok k amplifikaci parazitických linií patřících do rodu *Leucocytozoon* byl, z výše uvedených důvodů, vynechán. Pro úspěšnou detekci malárií rodu *Haemoproteus* a *Plasmodium* jsme namíchali reakci za použití 2 µl primerů HaemR2 a HaemF, 3 µl směsi všech deoxyribonukleotidů (Fermentas, Burlington, Kanada), 3 µl PCR pufru (Biotools, Madrid, Španělsko), 0,1 µl DNA polymerázy (Biotools, Madrid, Španělsko) a nakonec do celkového objemu 20 µl jsme doplnili vodu pro PCR (Qiagen, Hilden, Německo). Do reakce bylo ještě přidáno 10 µl produktu iniciální PCR, která byla před přimícháním zředěna v poměru 1:9 (do 10 µl produktu bylo přidáno 90 µl vody pro PCR). Protokol pro konečnou PCR se téměř shodoval s počáteční reakcí. Chyběla jen počáteční fáze inkubace při 94 °C trvající 10 minut a celkový počet probíhajících cyklů byl stanoven na 35. Všechny PCR reakce probíhaly v termocyclerech iCycler (Biorad, Hercules, USA).

Pro vyhodnocení přítomnosti parazitické DNA bylo 5 µl konečného PCR produktu nanášeno s 5 µl pufru na 2 % agarozový gel (Invitrogen, Carlsbad, USA). Pro srovnání délky fragmentů PCR byl nanášen také standard GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder známé délky (Fermentas, Burlington, Kanada). Po 30 minutách probíhající elektroforézy byly vyhodnoceny pozitivní a negativní vzorky na elektroforetogramu.

Při molekulární detekci byly použity negativní kontroly (na každých 11 vzorků připadla 1 negativní kontrola – voda pro PCR), aby bylo možné odhalit případné

kontamice, které mohly vzniknout kontaminací DNA infikovaného jedince v průběhu práce. Všechny vzorky byly testovány celkem třikrát, aby se omezilo nebezpečí výskytu falešně pozitivních vzorků. Pokud byly všechny negativní kontroly detekovány jako negativní, byl takový běh označen za úspěšný. Za skutečně pozitivní vzorky byly označeny ty, které vyšly v nezávislých bězích pozitivně alespoň dvakrát.

V rámci zavádění vhodné testovací metody jsme zkoušeli optimalizovat také jednoduchou PCR od autorů Drovetski et al. (2014). Tato molekulární metoda pracuje se třemi sadami primerů pro úspěšné zachycení úseku genu pro cytochrom b. Každý pár primerů se skládá z jednoho (stále se využívá ten samý) forward primeru a druhý, reversní primer, se pokaždé liší. Primery byly navrženy tak, aby měly schopnost amplifikovat co nejvíce haemosporidií uložených v databázi MalAvi. Bohužel se nám, ani po vyzkoušení gradientu $MgCl_2$ a testování odlišných druhů polymeráz, tuto metodu nepodařilo dostatečně optimalizovat.

Vzorky, které byly označeny jako pozitivní, jsme poslali na sekvenaci do holandské pobočky korejské firmy Macrogen v Amsterdamu v množství 25 μ l produktu nested PCR.

3.2.2 Bioinformatické přístupy: editace sekvencí a databáze

Sekvence byly editovány a alignovány v programu CodonCode Aligner 4.0.4 (CodonCode Corporation). U vzorků, které obsahovaly unikátní linie parazitů (jejich sekvence se lišila od známých linií uložených v databázi GenBank a MalAvi jednou nebo více záměnami), jsme provedli ještě 1 běh PCR. Vzniklé produkty byly opět odeslány na sekvenaci (tentokrát z druhého konce) do firmy Macrogen. Z obou komplementárních sekvencí byly vytvořeny kontigy, které se později využily k analýzám.

U všech vzorků byla zhodnocena kvalita jednotlivých sekvencí. Pokud byla sekvence nespecifická nebo nekvalitní, tak byl vzorek odeslán na opětovnou sekvenaci. V případě jeho opětovně nízké kvality nebo nespecificity, byl označen jako negativní.

Jednotlivé linie parazitů byly určovány nejprve pomocí databáze GenBank. V této databázi se ale poněkud často mohou jednotlivé určené linie objevovat hned pod několika různými názvy (Valkiūnas et al., 2008). Pro další práci se sekvencemi jsme tedy museli správnost určení linií ještě zkontrolovat v databázi MalAvi (Bensch et al., 2009). V této druhé databázi jsou uvedeny alternativní názvy všech ptačích parazitických linií ke

každému standardně používanému názvu malárií, a teprve s takto určenými liniemi jsme dále pracovali.

V této studii jsme detekovali i několik nových linií, které bylo potřeba pojmenovat. Názvy linií se ustanovují podle prvních dvou písmen rodového a prvních dvou písmen druhového názvu hostitele, a také se bere ohled na pořadí linie v dané studii. Podle dalších zvyklostí byly jednotlivé linie určeny jako nové, pokud se od známých haplotypů lišily alespoň jednou záměnou v sekvenci (Pérez-Tris et al., 2007).

Pro úspěšnou detekci případných smíšených nákaz rody *Haemoproteus* a *Plasmodium* bylo potřeba pečlivě projít každou sekvenci zvlášť a zkontrolovat případnou přítomnost dvojitých peaků. Námi použitý protokol od autorů Hellgren et al. (2004) totiž není schopný tyto dva rody od sebe spolehlivě rozlišit. Veškerá analýza sekvencí byla provedena v programu CodoneCode Aligner 4.0.4.

Po správném určení námi detekovaných parazitických linií v databázi MalAvi jsme v této databázi dohledali ještě veškeré informace o lokalitách a ptačích druzích, ve kterých se tyto parazité již vyskytovali. Na základě získaných dat byla porovnána specifita jednotlivých parazitických linií a bylo určeno pravděpodobné místo jejich přenosu (zimoviště nebo hnízdiště).

3.2.3 Statistické metody a další výpočty

Po určení jednotlivých linií malárií byla vypočítána celková prevalence (podíl počtu nakažených jedinců ku celkovému počtu jedinců v populaci), prevalence pro jednotlivé lokality (UK, ČR, Rumunsko, Turecko, Israel, Taiwan) a prevalence jednotlivých linií parazitů na lokalitách.

Průkaznost vlivu malárií na vybrané znaky fitness u populace z České republiky byla testována za pomoci programu R 3.2.0 (R Core Team). Pro výpočet byl použit binomický zobecněný lineární model (Crawley, 2007). Pro zjištění rozdílu mezi prevalencemi na jednotlivých lokalitách v České republice a mezi prevalencemi a pohlavími byl aplikován Wilcoxonův párový test.

Pro tvorbu haplotypové sítě jsme použili metodu Median-joining network. Tato metoda využívá pro výpočet haplosít kombinaci Farissova heuristického algoritmu pro maximální parsimonii a Kruskalova algoritmu pro výpočet minimální kostry grafu (preferující nejkratší spojení jednotlivých vrcholů v množině). Počítá se s aminokyselinovými sekvencemi nebo dalšími genetickými daty. Konečná haplotypová

síť ukazuje genetickou variabilitu mezi daty, rozdíly v sekvencích a jejich frekvenci v datasetu.

Výpočet byl proveden za pomoci programu Network 4.6.1.3 a jako vstupní soubor byl použit alignment sekvencí jednotlivých malarických linií, který byl zmnožen (počet každé linie se shodoval s počtem jejích detekcí). Pro každou lokalitu, kde byly jednotlivé linie malárií detekovány, byla zvolena specifická barva. Takto byly zobrazeny společné linie mezi jednotlivými lokalitami, jejich frekvence a rozdíly v sekvencích.

4 Výsledky

4.1 Prevalence

4.1.1 Celková prevalence na lokalitách

Molekulární metodou nested PCR bylo celkově vyšetřeno 1242 vzorků DNA z krve vlaštovek z 8 různých lokalit z celého světa a vyhodnoceno 207 vzorků jako pozitivních.

Z celkem 925 vzorků DNA krve vlaštovek odchycených v České republice bylo vyhodnoceno jako pozitivních na infekci *Haemosporidii* 180 jedinců. Celková prevalence tedy činí 19,3%.

Dále byla prevalence zjištěna i na jednotlivých zahraničních lokalitách (viz Tabulka 2). U americké populace vlaštovek pocházejících ze státu Colorado byla zjištěna prevalence 9,7%. U populace ovzorkované v New Yorku na lokalitě Ithaca byla prevalence pouhých 3,7%.

Ze vzorků pocházejících z Evropy byla nejvyšší prevalence (6,2%) naměřena u populace z Rumunska a nejnižší prevalenci (4,8%) vykazovaly vlaštovky z UK. Turecká populace činila 21,6%

Zcela bez nálezů zůstaly dvě populace – z Israele a z Taiwanu. Vzhledem k nízkému počtu vzorků z lokality nacházející se na Taiwanu, není tento výsledek příliš srovnatelný s ostatními.

Druh	Země	Počet nakažených		Prevalence
		jedinců	Celkový počet jedinců	
<i>H. r. erythrogaster</i>	Colorado	14	144	9,7%
<i>H. r. erythrogaster</i>	Ithaca (NY)	1	27	3,7%
<i>H. r. rustica</i>	UK	1	21	4,8%
<i>H. r. rustica</i>	Rumunsko	1	16	6,2%
<i>H. r. rustica</i>	Turecko	10	46	21,6%
<i>H. r. transitiva</i>	Israel	0	45	0,0%
<i>H. r. gutturalis</i>	Taiwan	0	18	0,0%

Tabulka 2: Prevalence na jednotlivých lokalitách.

4.2 Detekce genetických linií, smíšené linie

4.2.1 Nové linie

Detekovaných linií bylo celkem 24, z toho 6 nových linií, a patřily do rodů *Haemoproteus* a *Plasmodium* (viz Tabulka 3).

Parazitické linie rodu *Leucocytozoon* nebyly v této studii zjišťovány, protože pilotní pokusy provedené na několika málo vzorcích (134 vzorků) z České republiky ukazovaly velice malou prevalenci toho malarického druhu (0,0% až 2,9% v různých bžích). Získané prevalence jsou navíc jen orientační, jelikož kvalita získaných produktů PCR byla často velice malá.

Název linie	Rod linie	Lokalita	Počet detekcí
HIRUS16	<i>Haemoproteus</i>	ČR, Turecko	13, 1
HIRUS17	<i>Haemoproteus</i>	ČR	10
HIRUS18	<i>Plasmodium</i>	ČR	4
HIRUS19	<i>Plasmodium</i>	ČR	1
HIRUS20	<i>Plasmodium</i>	ČR	1
HIRUS21	<i>Plasmodium</i>	Colorado	11

Tabulka 3: Přehled nově detekovaných linií.

První dvě nově detekované linie patřily k rodu *Haemoproteus* a byly pojmenovány jako HIRUS16 a HIRUS17 (podle latinského názvu vlaštovky obecné – *Hirundo rustica*, číslo podle poslední nákazy se stejným názvem v databázi MalAvi). HIRUS16 se v naší databázi objevil celkem čtrnákrát, z toho třinákrát u populace z České republiky a jednou u populace z Turecka. Linie pojmenovaná názvem HIRUS17 byla detekována deskrát, opět u populace z ČR. Srovnáním sekvencí v programu CodonCode Aligner 4.0.4. bylo zjištěno, že se linie HIRUS16 liší od linie DELURB1 pouze jednou substitucí a linie HIRUS17 se od linie HIRUS01 odlišuje dvěma záměnami.

Zbýlé tři nově detekované linie patřily do rodu *Plasmodium*. Linie HIRUS18 byla detekována celkem čtyřkrát u vzorků z České republiky. Tato linie se lišila od dříve známé linie GRW02 jednou substitucí. Linie HIRUS19 se objevila pouze jednou, znovu u vlaštovek pocházejících z České republiky, a od známé linie GRW02 se také lišila pouze jednou záměnou, ale jinou než linie HIRUS18. Poslední detekovaná linie HIRUS20, která pocházela z ČR, byla zaznamenána opět jen u jednoho jedince. Od dříve známé linie GRW09 ji odděluje jedna záměna.

Poslední nová linie pojmenovaná jako HIRUS21 byla detekována u celkem jedenácti jedinců z populace pocházející ze státu Colorado v Americe. Srovnáním sekvencí bylo zjištěno, že se liší jen jednou substitucí od dříve určené linie DENPET03.

4.2.2 Linie rodu *Haemoproteus*

Z celkového počtu 24 detekovaných linií parazitů patřilo k rodu *Haemoproteus* 8 linií, včetně 2 nově určených HIRUS16 a HIRUS17. Celková prevalence zapříčiněná infekcemi tohoto rodu byla 4,9% (z celkového počtu 1071 jedinců, bez lokalit v Americe).

Pokud bychom chtěli započítat i vzorky získané v Americe, prevalence by byla o něco nižší (4,2%). Celkový počet vzorků by tak vzrostl na 1242.

Seznam linií a jejich výskyt na studovaných lokalitách jsou uvedeny v Tabulce 4.

Název linie	Colorado	Ithaca (NY)	UK	ČR	Rumunsko	Israel	Turecko	Taiwan	Celkem
CRYRE01	0	0	0	1	0	0	0	0	1
HIRUS16	0	0	0	13	0	0	1	0	14
HIRUS17	0	0	0	10	0	0	0	0	10
HIRUS02	0	0	0	1	0	0	0	0	1
HIRUS04	0	0	0	1	0	0	0	0	1
HIRUS05	0	0	0	8	1	0	7	0	16
PARUS1	0	0	0	1	0	0	0	0	1
WW2	0	0	0	8	0	0	0	0	8
Celkem nálezů	0	0	0	43	1	0	8	0	52
Prevalence	0,0%	0,0%	0,0%	4,6%	6,3%	0,0%	17,4%	0,0%	

Tabulka 4: Počty infikovaných jedinců liniemi rodu *Haemoproteus*.

Počet infikovaných jedinců byl obecně velice nízký, jak je vidět z Tabulky 4. U některých populací (Colorado, Ithaca, Taiwan) nedošlo k detekci žádné z uvedených linií rodu *Haemoproteus* (prevalence 0,0%). Naopak všechny linie byly detekovány u populace ptáků z České republiky.

Nejčastější byly linie HIRUS16 (13 vzorků) a HIRUS17 (10 vzorků) u ptáků pocházejících z Čech. Dalšími poměrně častými parazity byly HIRUS05 (8 vzorků z ČR a 7 vzorků z Turecka) a WW2 (8 vzorků, ale jen v ČR).

4.2.3 Linie rodu *Plasmodium*

Z 24 určených linií spadalo 16 do rodu *Plasmodium*, včetně 4 nově určených linií HIRUS18, HIRUS19, HIRUS20 a poslední se týká americké linie HIRUS21. Celková prevalence vypočítaná z celkového počtu 1071 jedinců (bez Ameriky) činila 14,4%. Po započtení vzorků z lokalit v Americe byla prevalence o něco nižší (12,4%).

Pro seznam jednotlivých linií, jejich četnosti na lokalitách a pro prevalenci v těchto skupinách Tabulka 5.

Název linie	Colorado	Ithaca (NY)	UK	ČR	Rumunsko	Israel	Turecko	Taiwan	Celkem
ACCTAC01	0	0	0	1	0	0	0	0	1
CYAOLI02	0	0	0	2	0	0	0	0	2
DENPET03	2	1	0	0	0	0	0	0	3
GRW04	0	0	0	0	0	0	1	0	1
GRW09	0	0	1	44	0	0	0	0	45
GRW02	0	0	0	52	0	0	0	0	52
HIRUS06	0	0	0	2	0	0	0	0	2
HIRUS18	0	0	0	4	0	0	0	0	4
HIRUS19	0	0	0	1	0	0	0	0	1
HIRUS20	0	0	0	1	0	0	0	0	1
HIRUS21	11	0	0	0	0	0	0	0	11
LINOLI01	0	0	0	1	0	0	1	0	2
PADOM17	1	0	0	0	0	0	0	0	1
PSEGRI01	0	0	0	2	0	0	0	0	2
RFF1	0	0	0	1	0	0	0	0	1
SYBOR21	0	0	0	25	0	0	0	0	25
Celkem nákaz	14	1	1	136	0	0	2	0	154
Prevalence	9,7%	3,7%	4,8%	14,7%	0,0%	0,0%	4,3%	0,0%	

Tabulka 5: Počty infikovaných jedinců liniemi rodu *Plasmodium*.

I u linií rodu *Plasmodium* byly naměřeny buďto nízké, nebo zcela nulové (Israel, Rumunsko, Taiwan) prevalence. Nejčastěji zjištěnými liniemi byly GRW02 (52 jedinců v ČR), GRW09 (44 jedinců v ČR) a linie detekovaná z amerických vzorků HIRUS21 (11 jedinců ve státě Colorado). Stejně jako v případě linií rodu *Haemoproteus*, i zde byla detekována většina linií ve vzorku z ČR a prevalence nepřesáhla 15%.

4.2.4 Prevalence v různých letech

Prevalence, zaznamenaná u ptáků z Čech, se během let měnila. V roce 2010 byla zjištěna prevalence pouhých 9,4%. Následující rok 2011 byla prevalence 12,7%. V roce 2012 bylo nakaženo celkem 22,9% ptáků a v roce 2013 byla detekována prevalence 24,2% (viz Tabulka 6).

Rok	Počet nakažených jedinců	Celkový počet jedinců	Prevalence
2010	14	149	9,4%
2011	23	180	12,7%
2012	46	199	22,9%
2013	97	397	24,2%
celkové počty	180	925	19,3%

Tabulka 6: Prevalence zaznamenaná během let 2010 – 2013.

4.2.5 Smíšené infekce

U několika málo jedinců byla zaznamenána přítomnost více nákaz najednou. Z celkového počtu 207 infikovaných jedinců byli pouze tři jedinci infikováni dvěmi nákazami najednou. U jednoho jedince se jednalo o smíšenou infekci způsobenou liniemi HIRUS05 a GRW09, u druhého liniemi GRW02 a HIRUS06 a u posledního jedince šlo o mix linií GRW02 a SYBOR21.

Některé jedince se podařilo zpětně odchytit v rozmezí let 2010 – 2013 několikrát. Měli jsme tak možnost analyzovat vzorek krve z různých let a zjistit, zda byla opět detekována stejná linie, nebo došlo k nakažení další parazitickou malárií.

Výskyt linií u opakovaně odchycených jedinců je uveden v Tabulce 7.

Jedinec	2010	2011	2012	2013
92672	x	x	GRW02	GRW02
241273	x	x	GRW09	GRW09
241293	x	x	GRW09	GRW09
528406	x	GRW09	GRW09	GRW09
529481	GRW02	x	x	HIRUS16
529493	GRW02; SYBOR21	x	SYBOR21	x
529900	HIRUS02	HIRUS02	x	x
529923	x	WW2	x	GRW02
529936	x	HIRUS17	x	GRW09
529961	x	GW02	x	GRW02
539478	x	x	GRW02	GRW02
539481	x	SYBOR21	SYBOR21	GRW02
540429	x	x	SYBOR21	SYBOR21
540461	x	x	GRW09	GRW09
540893	x	x	GRW02	GRW02
590552	x	x	GRW02	SYBOR21
590560	x	x	GRW09	GRW09
590571	x	x	HIRUS17	HIRUS17
590581	x	x	GRW02; HIRUS06	x
678017	x	x	x	HIRUS05; GRW09

Tabulka 7: Linie u opakovaně odchycených jedinců.

4.3 Linie vlaštoky obecné na lokalitách

4.3.1 Linie vlaštoky obecné vůči migračnímu rozhraní

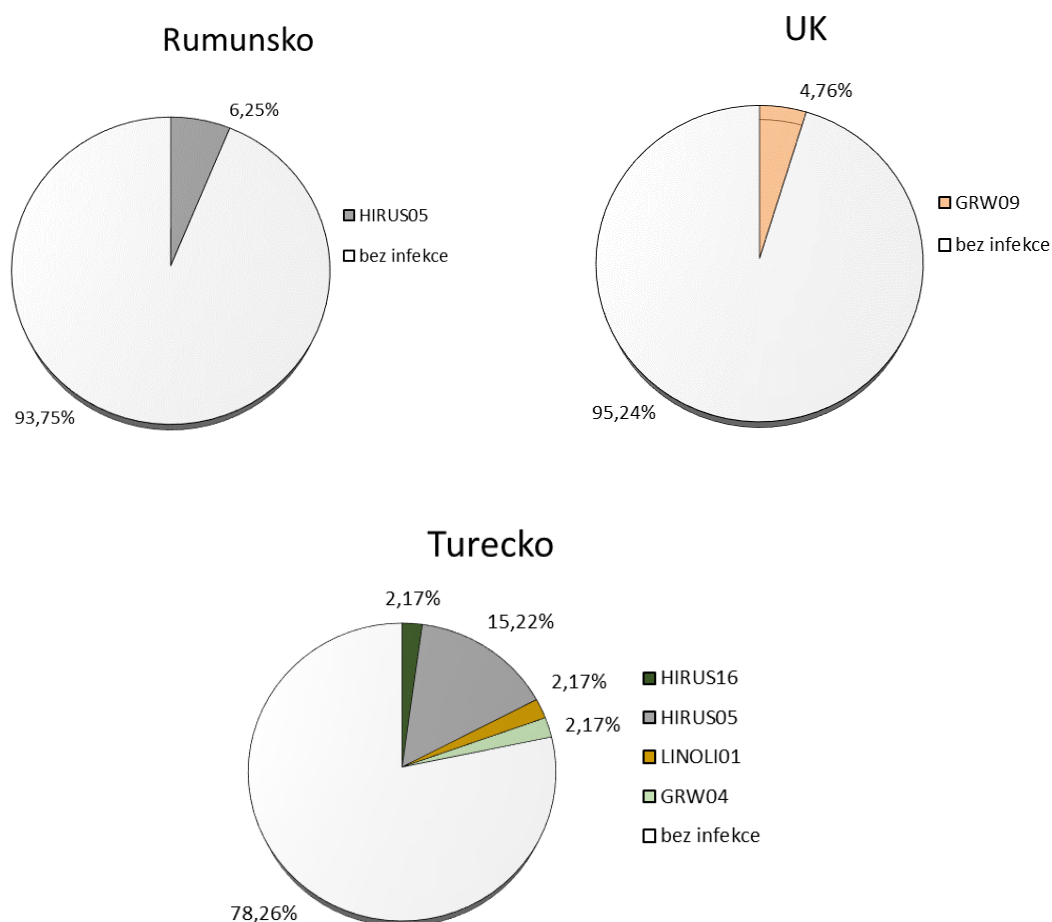
Všechny analyzované vzorky vlaštoky obecné byly rozděleny podle lokalit a byla vypočítána prevalence pro jednotlivé parazitické linie. Dále bylo určeno procento jedinců nacházejících se na dané lokalitě, kteří byly označeni jako negativní na nákazu způsobenou parazity skupiny Haemosporidia.

Pro lepší přehlednost a snazší srovnání rozdílů v zastoupení jednotlivých malarických linií mezi danými lokalitami napříč migračním rozhraním byly vytvořeny koláčové grafy. Každý graf obsahuje informace o prevalencích, složení linií na dané lokalitě, jejich počet a množství neinfikovaných jedinců (viz Obr.8). Pro lokality nacházející se v České republice byl zhotoven pouze jeden koláčový graf (viz Obr.9),

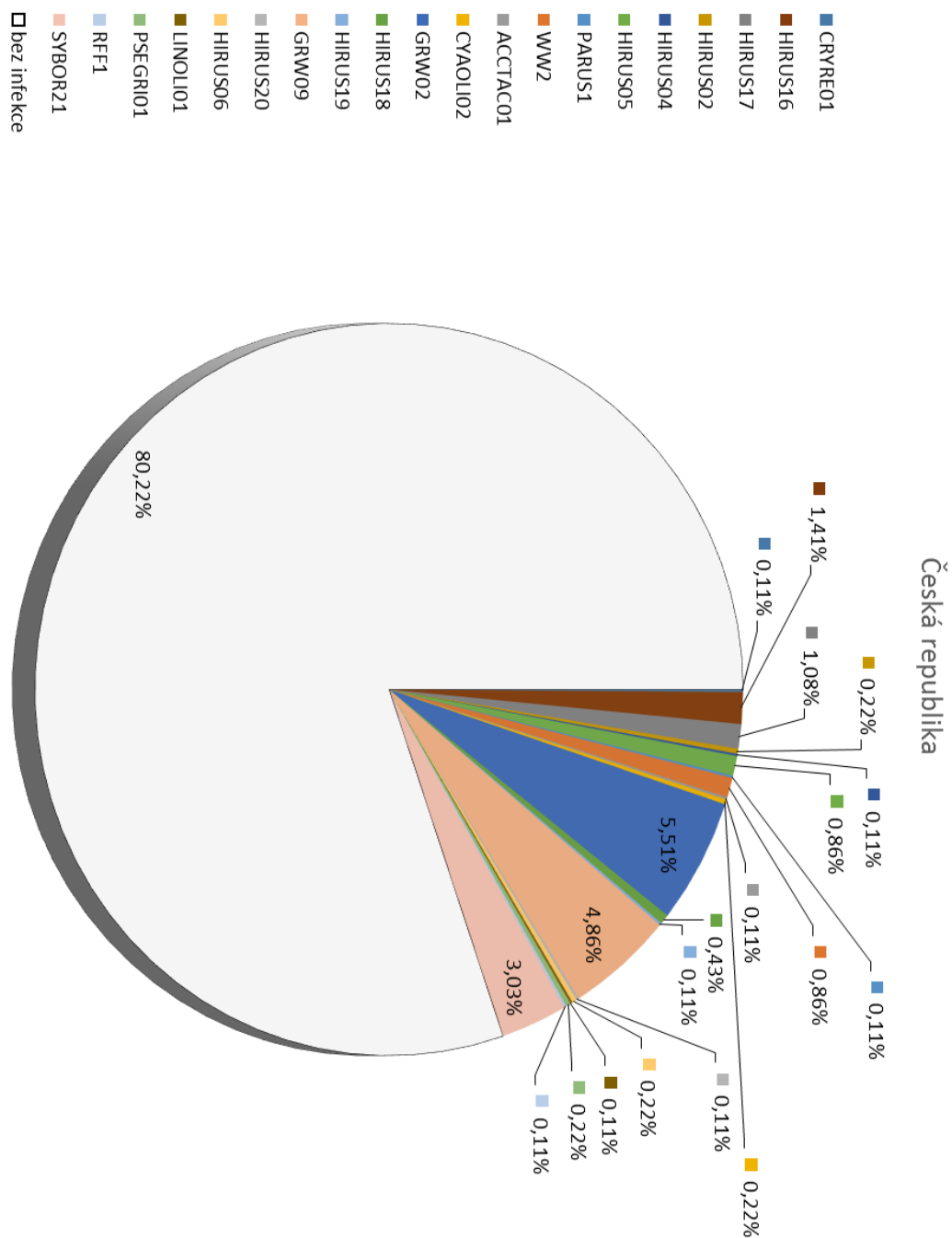
protože jednotlivé lokality budou podrobněji popsány v podkapitole Linie vlaštovky obecné na jednotlivých lokalitách v České republice.

Lokality ptáků, kteří migrují západní cestou, zde zastupuje populace z UK. Zda touto cestou migrují i ptáci z některé lokality nacházející se v České republice, zatím nevíme. Lokality ptáků migrujících východní cestou představuje Rumunsko a Turecko. Populace z Israele migrační tah nepodstupují, jsou rezidentní. Nebyly u ní detekovány žádné parazitické linie, a proto pro tuto lokalitu zde koláčový graf chybí.

Na těchto jednoduchých grafech jsou na první pohled patrné rozdíly v zastoupení jednotlivých linií a v jejich prevalencích u dané populace. Například na lokalitách vlaštovek, které migrují východním směrem, se objevuje linie HIRUS05, která chybí u ptáků migrujících západní cestou, a naopak.



Obr. 8: Grafy parazitických linií na daných lokalitách.

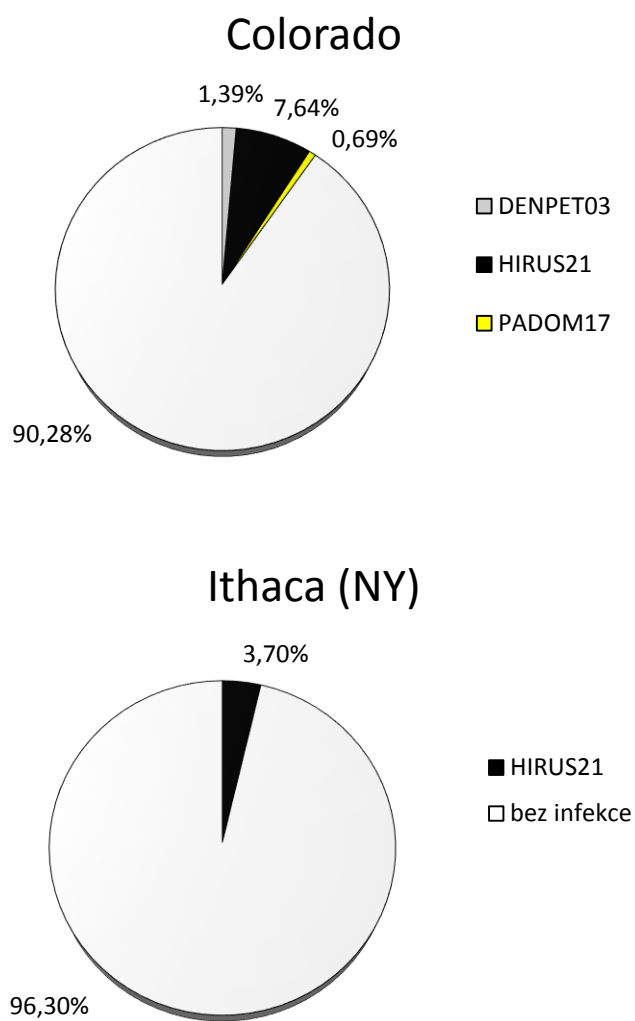


Obr. 9: Graf parazitických linií v České republice.

4.3.2 *Linie vlaštoky obecné v Severní Americe*

Koláčové grafy byly vytvořeny také pro snazší srovnání zastoupení malarických linií mezi dvěma lokalitami v Americe. I zde obsahuje každý graf informace o prevalencích, složení linií na lokalitách, jejich počtu a množství nenakažených jedinců (viz Obr.10).

Na první pohled je patrné, že linie HIRUS21 se vyskytovala u obou populací, a že oproti linii PADOM17 a linii DENPET03, které byly detekovány pouze na lokalitě v Coloradu, byla poměrně častá.



Obr. 10: Graf parazitických linií na dvou lokalitách v Severní Americe.

4.3.3 *Linie vlaštoky obecné na jednotlivých lokalitách v České republice*

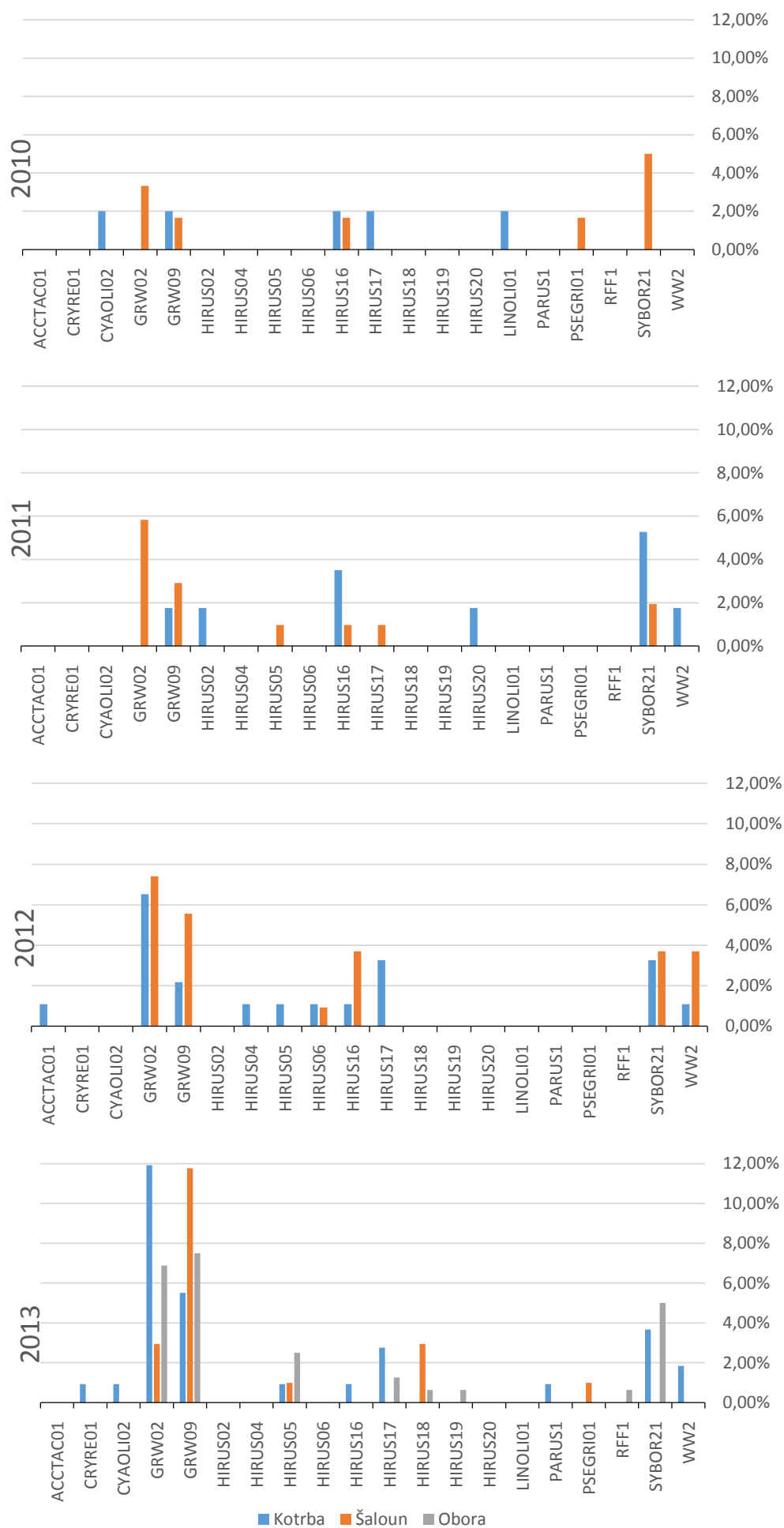
Jelikož jsme měli k dispozici vzorky ze třech různých lokalit z České republiky, mohli jsme mezi sebou porovnat rozdíly v zastoupení jednotlivých prazitických linií.

V letech 2010 – 2012 probíhaly terénní práce na lokalitách Kotrba a Šaloun. V roce 2013 se k těmto dvěma lokalitám přidala ještě jedna lokalita – Obora. Porovnali jsme tak mezi sebou distribuci linií na dvou místech Kotrba a Šaloun v rozmezí let 2010 – 2012 a v roce 2013 jsme mohli naše pozorování rozšířit ještě o místo zvané Obora.

Pro účely jednoduchého vizuálního porovnání složení a prevalence jednotlivých parazitických linií byly vytvořeny sloupcové grafy pro jednotlivé roky se všemi lokalitami (viz Obr. 11).

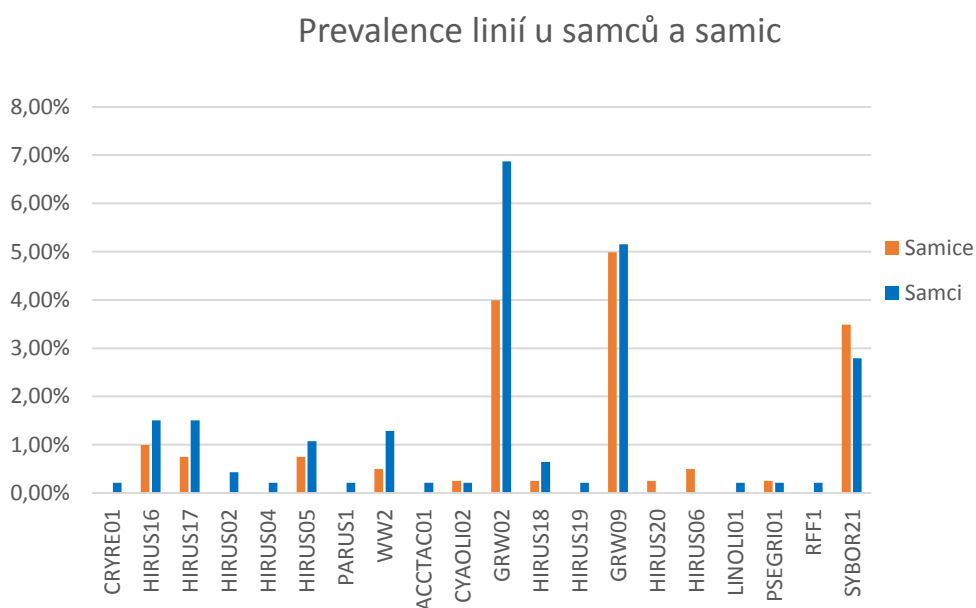
Z grafů například vyplývá, které linie byly detekovány na všech třech lokalitách (GRW09), a které se objevily pouze jednou a jen v jednom roce (např. linie RFF1 v roce 2013 na lokalitě Obora). Je zřejmé, že linie GRW02, GRW09 a SYBOR21 patřily k nejčastěji se vyskytujícím a i jejich prevalence vykazovaly jedny z nejvyšších naměřených hodnot.

Největší množství linií bylo zaznamenáno roku 2013, patrně kvůli největšímu počtu ovzorkovaných jedinců v tomto roce. Bylo tak možné zachytit i méně časté linie. Oproti tomu v roce 2010 byl zase detekován nejmenší počet malárií.



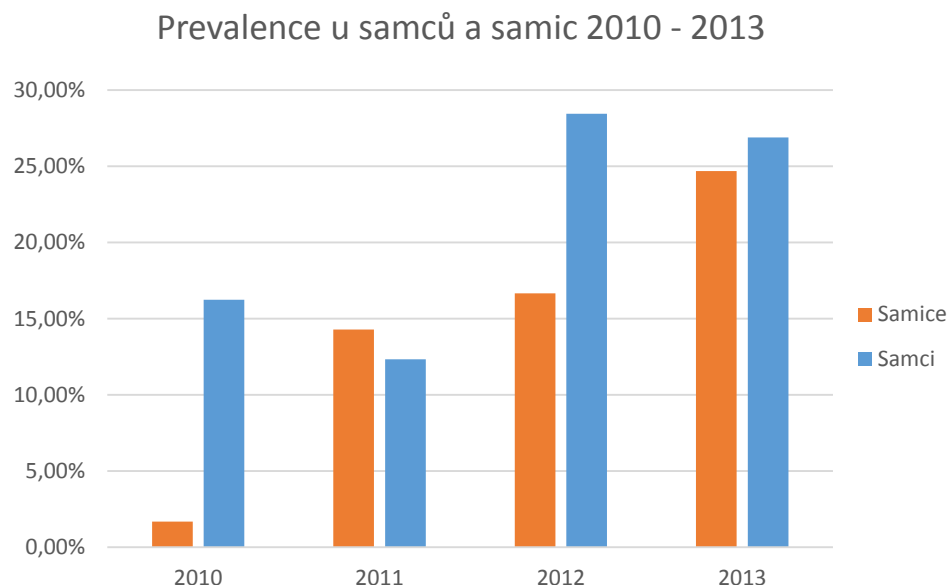
Obr.11: Grafy všech parazitických linií na lokalitách v Česku v rozmezí let 2010 – 2013.

Pomocí sloupcových grafů byla porovnána také prevalence u samců a samic mezi jednotlivými liniemi. Na první pohle je patrné, že nejčastěji zastoupenými liniemi byly mezi oběma pohlavími GRW02, GRW09 a SYBOR21. Některé malárie, jako například CRYRE01 nebo HIRUS04 se vyskytovaly pouze u samců, zatímco jen u samic byly detekovány například HIRUS20 či HIRUS06. Většina parazitů, kromě GRW02, GRW09 a SYBOR21, nevykazovali příliš vysoké hodnoty prevalence a většinou byli zastoupeni u obou pohlaví (viz Obr.12).



Obr. 12: Graf parazitických linií u samců a samic. Na svislé ose jsou uvedeny prevalence a na vodorovné ose jsou vypsány jednotlivé linie.

Pro rozdíl mezi celkovými prevalencemi v rozmezí let 2010 – 2013 mezi samci a samicemi byl zhotoven následující graf (viz Obr. 13). Samice bývají méně nakaženy maláriemi než samci, pouze v roce 2011 byla situace opačná. Prevalence se měnila také během let a nejvyšších hodnot u samců (přes 25%) dosahovala roku 2012. U samic byla nejvyšší prevalence v roce 2013 a dosahovala téměř 25%, nejmenší prevalence vykazovaly v roce 2010. Samci byli nejméně nakaženi v roce 2011.



Obr. 13: Graf parazitických linií u samců a samic v rozmezí let 2010 – 2013. Na svislé ose jsou uvedeny prevalence a na vodorovné ose jsou vypsané jednotlivé linie.

4.4 Median-joining Network

Uvedená konečná haplosíť (viz Obr.14) znázorňuje parazitické linie rodu *Haemoproteus* i rodu *Plasmodium*. Na haplosíti je patrné, že většina detekovaných linií (z obou rodů) byla zachycená ve velkém vzorku z Čech.

Nejčastějšími liniemi z rodu *Plasmodium* jsou linie GRW02, GRW09 a SYBOR21. Zatím co linie GRW02 a SYBOR21 byly detekovány pouze u ptáků z České republiky, vzdálenější linie GRW09 byla zachycena i u populace z UK. Všechny tři uvedené linie se vyskytovaly na všech výzkumných lokalitách (Kotrba, Šaloun, Obora) v Čechách, jak je patrné z Obr.11.

Nově určené linie rodu *Plasmodium* HIRUS18 a HIRUS19, které se od GRW02 liší jen jednou záměnou, se vyskytovaly pouze u ptáků z Čech. HIRUS18 byl zachycen ve vzorku ptáků pocházejících ze dvou lokalit - Šaloun a Obora, zatímco linie HIRUS19 pouze ve vzorku z lokality Obora.

Další nově určenou linií je HIRUS20, který se od linie GRW09 odlišuje opět jen jednou záměnou. I tato linie byla zachycena jen u ptáků ovzorkovaných v České republice, a to na lokalitě Kotrba.

Ostatní parazitické linie patřící do rodu *Plasmodium*, které byly zachyceny pouze u populace z České republiky (ACCTAC01, CYAOLI02, HIRUS06, PSEGRI01 a RFF1),

se u ptáků téměř nevyskytovaly. Ve většině případů se jedná o nákazu u jednoho jedince z jedné lokality. Například linie RFF1 byla detekována v roce 2013 u jedince pocházejícího z lokality Obora. Linie ACCTAC01 a CYAOLI02 se také nevyskytovaly příliš hojně a obě byly zaznamenány u populace z lokality Kotrba. Maláriemi PSEGRI01 byl nakažen pták z lokality Šaloun a HIRUS06 se vyskytoval na lokalitách Kotrba a Šaloun.

Poslední linií náležející do rodu *Plasmodium*, která byla zachycena v České republice na lokalitě Kotrba, je nepříliš častá LINOLI01. Tato linie byla navíc v naší studii sdílena s ptáky z lokality nacházející se v Turecku (viz Obr.8 a 11). Pouze u ptáků pocházejících z Turecka byla detekována ještě jedna linie, také poměrně vzácná, označující se jako GRW04 a patřící do rodu *Plasmodium*. Poslední dvě uvedené linie (LINOLI01 a GRW04) jsou si poměrně blízké, liší se od sebe pouze jednou sekvencí.

U vlaštovek pocházejících ze Severní Ameriky byly detekovány celkem tři parazitické linie patřící do rodu *Plasmodium*. První z nich se označuje jako DENPET03 a liší se jen jednou záměnou od nově určené linie HIRUS21, taktéž zachycené u populace z Ameriky. HIRUS21 byla nejčastěji určenou linií u ptáků z této lokality. Naopak nejméně běžnou linií u severoamerické populace vlaštovek byla třetí linie PADOM17, která se svou sekvencí zcela odlišuje od předešlých dvou linií a v haplotypové síti se od nich nachází poměrně daleko.

Na vyznačeném místě v haplosíti pro rod *Plasmodium* tedy vidíme, že většina zachycených linií se vyskytuje pouze u ptáků z České republiky. Můžeme si také povšimnout, že parazitické linie sdílené mezi ptáky z Čech a z Turecka a mezi UK a Českou republikou jsou zcela odlišné. Úplně jiné malárie než v Evropě mají ptáci z Ameriky.

Část haplosítě ukazující parazitické linie rodu *Haemoproteus* zahrnuje malárie detekované v převážné většině opět jen u ptáků z České republiky. Jednou z nejčastěji vyskytujících se linií je WW2. Ptáci nakažení tímto parazitem byly ovzorkováni na lokalitách Kotrba a Šaloun (viz Obr.11).

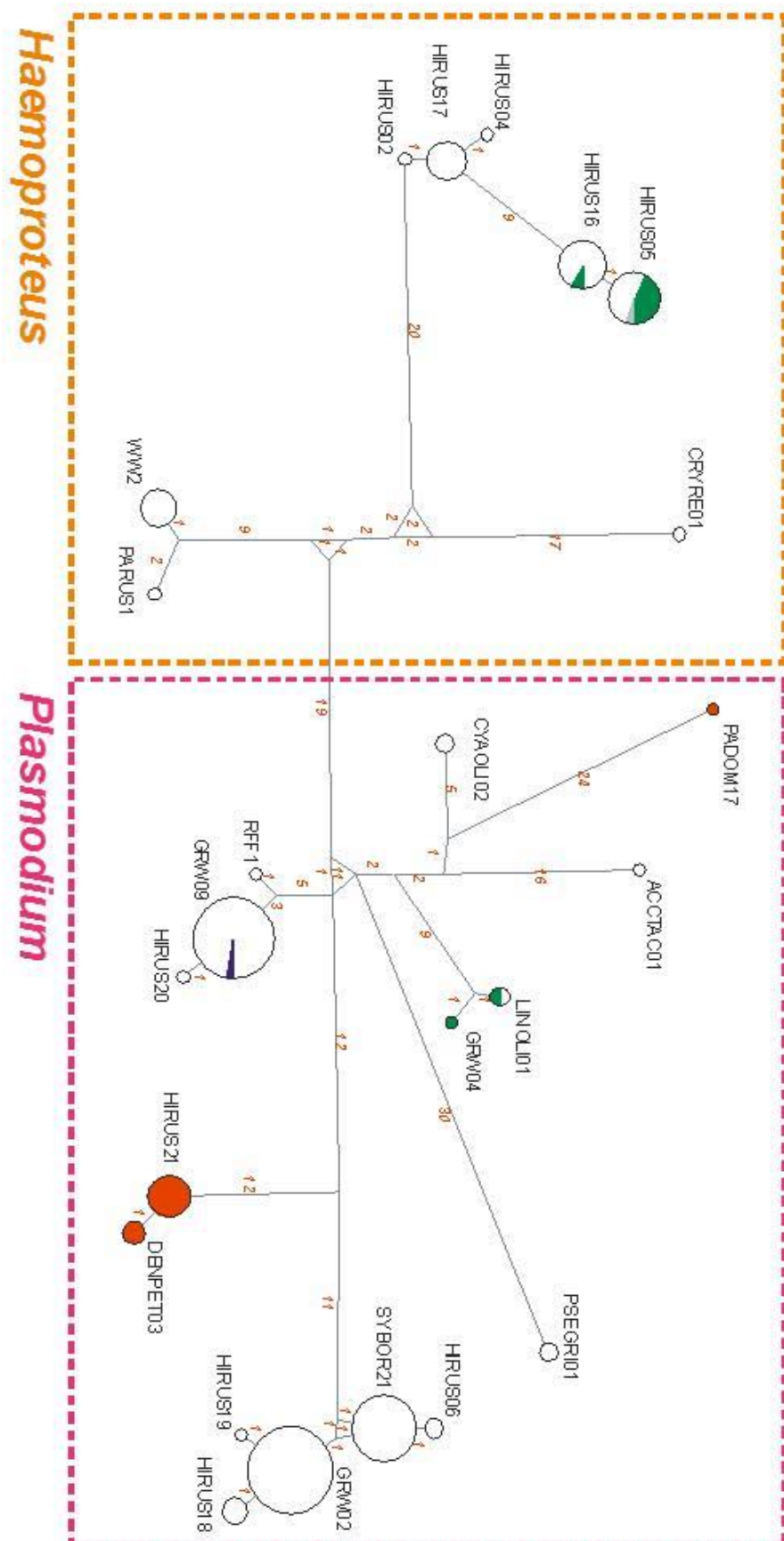
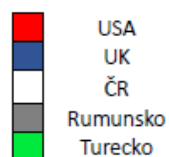
Další poměrně častou malárií patřící do rodu *Haemoproteus*, kterou zaznamenala naše studie na lokalitách v Čechách – Kotrbě a Šalounu, je HIRUS17. Jedná se o nově detekovanou linii, která se liší od HIRUS02 a od HIRUS04 pouze jednou záměnou. Obě uvedené linie byly detekovány ve velice malém vzorku a pouze na lokalitě Kotrba (viz Obr.11).

Posledními zaznamenanými maláriemi z rodu *Haemoproteus*, které se vyskytovaly pouze u ptáků v Čechách, byly linie PARUS1 a CRYRE01. Obě nákazy byly detekovány u vzorku pocházejícího z lokality Kotrba a v obou případech se jednalo o detekci pouze u jednoho infikovaného jedince.

Poměrně hojné malárie patří rovněž do rodu *Haemoproteus*, které infikovaly větší množství ptáků, spadaly do nově určené linie HIRUS16, která se od již známé linie HIRUS05 liší jen jednou záměnou. HIRUS16 byla zjištěna na lokalitách Kotrba a Šaloun a také u ptáků pocházejících z Turecka (viz Obr.8 a 11). V Turecku nebyla tolik rozšířená jako v Čechách.

Poslední linií z rodu *Haemoproteus*, a poměrně rozšířenou, je HIRUS05. Tato malárie byla zachycena u ptáků v Čechách na všech výzkumných lokalitách, a také u populace pocházející z Turecka a Rumunska (viz Obr.8 a 11). Zdá se, že je opět nejvíce rozšířenou u ptáků v České republice, zatímco v Rumunsku se moc vyskytuje.

Na oranžově vyznačeném místě v haplosíti, kde se nachází linie rodu *Haemoproteus*, se tedy vyskytují převážně linie detekované pouze u ptáků v Čechách. Najdeme zde sdílenou linii mezi populacemi z Čech a z Turecka a jednu linii společnou pro ptáky z lokalit pocházejících z téže země, avšak také z lokality nacházející se v Rumunsku. Pokud mezi sebou srovnáme linie pocházející z obou rodů, můžeme si povšimnout, že malarických linií patřících do rodu *Plasmodium* je více než linií rodu *Haemoproteus*. Dalším rozdílem je, že mezi liniemi z rodu *Plasmodium* byly detekováni parazité také v UK a v Severní Americe, na rozdíl od rodu *Haemoproteus*, kde byl nález pro tyto lokality negativní.



Obr. 14: Haplotypová síť všech detekovaných parazitických linií. Rody *Plasmodium* a *Haemoproteus* jsou znázorněny rámečky. Velikost kruhů odpovídá poměrnému zastoupení linií v datasetu, barva pak lokality–vlevo nahoře legenda. Čísla vyjadřují pozice záměn mezi liniemi.

4.5 Pravděpodobné lokality přenosu malárií

Na základě informací o jednotlivých malarických liniích zjištěných z databáze MalAvi, byly určeny pravděpodobné lokality přenosu linií detekovaných v naší studii – Afrika, Evropa nebo, v případě amerických linií, Amerika. Pro lepší přehlednost byly zhotoveny tabulky (viz Přílohy; Tabulka 8 a 9), ve kterých jsou uvedeny jednotlivé parazitické linie, jejich zařazení do rodu, rody již nakažených ptáků a pravděpodobné místo přenosu. V tabulkách nejsou uvedeny nově detekované linie HIRUS16, HIRUS17, HIRUS18, HIRUS19, HIRUS20 a HIRUS21.

U většiny detekovaných linií se zdá být pravděpodobným místem přenosu Afrika. V případě malárií WW2 a PARUS1 je možná infekce spíše v Evropě. Linie WW2 byla již v minulosti určena u sýkor, které migrační tah do subsaharské Afiky nepodstupují. U sýkor byla objevena i linie PARUS1. Nicméně tato linie byla detekována i u migrujících ptáků. U linií detekovaných pouze u vlaštovek (HIRUS02, HIRUS04 a HIRUS05) může být místem přenosu jak Afrika, tak i Evropa. V případě linie SYBOR21 zůstává otázka přenosu taktéž otevřená, neboť tento parazit byl zatím detekován jen u vlaštovek a pěnic.

K nákazám americkými maláriemi DENPET03 a PADOM17 pravděpodobně dochází na lokalitách v Jižní Americe.

4.6 Vliv malárií na kondici, fitness a sekundární pohlavní znaky u vlaštovek

Pro testování vlivu malárií na kondici, fitness a sekundární sexuální znaky u vlaštovek byl použit binomický zobecněný lineární model v programu R 3.2.0 a metoda zpětné eliminace.

Do prvního modelu pro testování vlivu malárií byly zahrnuty následující hodnoty: pohlaví a věk jedince, lokalita a rok odchytu, a nakonec také objem hlavy. Žádný z uvedených znaků nevyšel jako signifikantní, proto byla zvolena metoda zpětné eliminace. Ani po dosažení nejjednoduššího možného modelu, ve kterém zůstalo pouze pohlaví, nebyl prokázán signifikantní vliv. Výsledky jsou uvedeny v Příloze, viz Tabulka 10.

V druhém modelu byla testována změna kondice při prokázané nákaze. Do modelu byla, kromě informace o infekci, zahrnuta délka křídla, tarsu a tělesná hmotnost jedince. Model byl zjednodušen zpětnou eliminací, ale ani v tomto případě nedošlo

k prokázání vlivu malarické infekce na některou z výše uvedených složek (viz Přílohy; Tabulka 11).

Dále byla porovnávána fitness dosažená během prvního hnízdění a celková fitness jedince. Model byl analyzován zvlášť pro samice a samce, aby se mohl porovnat rozdíl mezi oběma pohlavími. Ani u jednoho pohlaví nevyšel signifikantní výsledek (viz Přílohy; Tabulka 12 a 13).

Do analýzy sekundárních pohlavních znaků byla zahrnuta data o sytosti zbarvení peří, hodnoty vypovídající o UV odstínu (tradičnímu viditelnému) peří a délka pravého rýdovacího pera pro každého jedince. Model byl opět testován zvlášť pro samce a samice. Zatímco u samců nebyl nalezen průkazný vliv malárií na zbarvení opeření, a ani na délku ocasních per, u samic byl nalezen signifikantní vztah pro jednu z uvedených hodnot pro odstín peří ($P = 0.0331^*$). Slabě nad průkazností byl u samic také vztah pro délku pravého rýdovacího pera (viz Přílohy; Tabulka 14 a 15).

Wilcoxonovým párovým testem byl nejprve testován vztah mezi prevalencemi malárií u vlaštovek na lokalitách Kotrba a Šaloun, a poté vztah mezi prevalencemi a pohlavími. V obou případech opět nevyšel signifikantní rozdíl, ale obě vypočtené pravděpodobnosti (pro srovnání lokalit $p\text{-value} = 0.07225$; pro srovnání pohlaví $p\text{-value} = 0.06618$) se hladině významnosti 0.05 přibližovaly (viz Přílohy; Tabulka 16 a 17).

5 Diskuze

5.1 Prevalence

Hodnoty celkové prevalence ptačích haemosporid, zjištěné v této studii, jsou obecně malé pro všechny zkoumané lokality. Nejvyšší prevalence byla zjištěna u ptáků z České republiky (19,3%). Na některých lokalitách dosahovala prevalence i nulových hodnot. V porovnání se studiemi zkoumajících malárie na jiných druzích ptáků jsou tyto hodnoty poměrně nízké (Durrant et al., 2008; Pagenkopp et al., 2008; Marzal et al., 2011; Santiago-Alarcon et al., 2011; Synek et al., 2013). Vzhledem k tomu, že vlaštovka patří mezi ptáky migrující každoročně na dlouhé vzdálenosti, bychom míru prevalence čekali vyšší. K nálezům maláriemi může totiž docházet jak na hnízdištích, tak i na zimovištích (Waldenström et al., 2002). Vysvětlení toho jevu není úplně jednoznačné a důvodů může být hned několik. Vlaštovky náleží mezi vzdušné lovce s vysokou rychlostí letu. Dá se tedy předpokládat, že po většinu dne jsou pro přenašeče zcela nedostupné. Na druhou stranu je známo, že na zimovištích nocují v rákosí u vodních zdrojů, kde bývá krevsajícího hmyzu dostatek. Rozdíly v prevalenci mezi jednotlivými druhy tedy mohou být způsobeny především odlišnou expozicí hostitelů vektorům (Yohannes et al., 2009). Proto můžeme najít rozdíly jednak v rámci jednoho hostitelského druhu (Bentz et al., 2006), ale dokonce i v rámci jedné populace obývajících různé lokality (Wood et al., 2007). Alternativním vysvětlením zjištěných nízkých prevalencí může být celková energetická náročnost migrace. Nakažení jedinci bývají také méně aktivní a v počátečních fázích nákazy umírají ti, jejichž hodnoty parazitémie jsou nejvyšší (Valkiūnas, 2005).

Naše studie měla možnost srovnat prevalence u různých populací vlaštovek. Zatímco v České republice byla prevalence 19,3%, v Turecku již byla nižší (21,6%) a v Israeli a na Taiwanu byly její hodnoty zcela nulové. Tento veliký rozdíl může být zapříčiněn odlišnými vzorci v migračním chování, které jsou u vlaštovek známé (Cramp et al., 1988).

5.2 Detekce genetických linií, smíšené linie

5.2.1 Diverzita linií u vlaštovky obecné

Celkový počet detekovaných linií malárií dosáhl poměrně vysokého počtu (24). Celková prevalence (včetně ptáků z Ameriky) způsobená parazity rodu *Haemoproteus* a rodu *Plasmodium* se poměrně dobře shoduje s naměřenými hodnotami autorů studie Rönn et al. (2015).

Relativně vysoký počet námi detekovaných linií u vlaštovky obecné není překvapivý, protože se jedná o migranta na dlouhé vzdálenosti. Ptáci migrující na dlouhé vzdálenosti jsou vystaveni větší pravděpodobnosti nákazy parazity. K přenosu malárií může totiž docházet na hnízdišti, na zimovišti a i během samotného tahu. U ptáků s migračním chováním najdeme často více parazitických linií než u ptáků nemigrujících (Waldenström et al., 2002; Bensch et al., 2007; Ortego et al., 2008).

Některé z detekovaných linií v této studii byly určeny poprvé, jako například linie HIRUS16 a HIRUS17. Linie HIRUS02, HIRUS04, HIRUS05 a HIRUS06 byly již detekovány ve studii Rönn et al., (2015). U jiného ptačího druhu zatím popsány nebyly. Zdá se, že vlaštovky bývají nakaženy jak malarickými specialisty, tak i generalisty (např. linie WW2 nebo RFF1).

5.2.2 Linie vlaštovky obecné v Severní Americe

K divergenci a rozsáhlé expanzi jednotlivých poddruhů vlaštovek došlo poměrně nedávno (Zink et al., 2006; Dor et al., 2010). Dalo by se tedy předpokládat, že si vlaštovky své parazity, s kterými již prošly společnou koevolucí, také ponesou s sebou na nová území (Marzal et al., 2011).

U amerického poddruhu vlaštovek byly detekovány celkem tři parazitické linie – PADOM17, DENPET03 a nově určená HIRUS21. Všechny vykazovaly nízké hodnoty prevalence podobně, jako linie nalezené v Evropě. Žádná z těchto malárií se nevyskytovala u poddruhu obývajícím Starý svět. Linie PADOM17 a DENPET03 byly již dříve známy z jiných amerických druhů ptáků, jak je vidět z Tabulky 8 v Přílohách.

Tento výsledek se shoduje s prací autorů Marzal et al. (2011), kteří dospěli k podobným závěrům ve své studii týkající se vrabce domácího (*Passer domesticus*). Autoři se v ní zabývali zjišťováním diverzity malárií napříč celým světem. Zjistili, že u tohoto druhu ptáka došlo během kolonizace nových území ke ztrátě původní parazitické fauny a

ta byla posléze nahrazena parazity z nového území. Hodnoty prevalence u vrabců byly taktéž nízké.

5.2.3 *Nové linie*

Detekovali jsme celkem 6 nových linií, z nichž do rodu *Haemoproteus* patřily 2 linie a do rodu *Plasmodium* náležely 4 linie, a byly pojmenovány podle již daných pravidel (Pérez-Tris et al., 2007). Všechny nově určené linie, kromě jedné americké, byly zaznamenány u ptáků z Čech a jedna z linií se vyskytovala i u populace z Turecka.

Tyto nově určené linie nebyly nikdy dříve zjištěny u jiných ptačích druhů, ani ve studii autorů Rönn et al., (2015). Rozdíl v detekovaném množství parazitů mezi oběma studii může být zapříčiněn tím, že naše vzorky pocházely z mnohem většího území, než vzorky zkoumané ve studii Rönn et al., (2015), a také byly z úplně jiných lokalit.

5.3 Linie vlaštovky obecné na lokalitách

5.3.1 *Linie vlaštovky obecné vůči migračnímu rozhraní*

V naší studii byly zaznamenány rozdíly v distribuci a prevalenci některých parazitických linií napříč migračním rozhraním u vlaštovky, které byly vizualizovány pomocí koláčových grafů (viz Obr.8 a 9) a haplosítě (viz Obr.14).

Pro část ptáků z Čech a pro východně migrující populace z Rumunska a z Turecka byla nalezena shoda ve sdílení některých malarických linií. Společnou nákazu s nakaženými jedinci z Čech, ale odlišnou než pro východně táhnoucí populace, vykazovaly také západně migrující ptáci z UK. U nemigrujících populací nebyly nalezeny žádné nákazy způsobené maláriemi.

Tyto zjištěné rozdíly napříč různými populacemi jsou patrně zapříčiněné rozdílnými tahovými cestami při migraci, nebo rozdílnými zimovišti v Africe (Waldenström et al., 2002; Bensch et al., 2007). Sdílení společných parazitů u vlaštovek z Turecka a Rumunska může poukazovat na využívání stejných tahových cest nebo stejných lokalit pro zimoviště. Populace z UK migrují západní cestou a tomu odpovídají i unikátní parazitické linie, které nejsou sdíleny společně s populacemi z východu.

Naše výsledky jsme porovnali s předchozími výzkumy, které se zabývaly geografickou distribucí parazitů u jiných druhů ptáků. U některých z nich nebyla potvrzena žádná strukturovanost (Fallon et al., 2006; Durrant et al., 2007; Pagenkopp et

al., 2008). Jen ve studii od autorů Durrant et al. (2008) našli velmi omezenou strukturovanost u jedné malé subpopulace. Nicméně populace druhů, které byly zkoumány v těchto pracích, pravděpodobně nemigrovaly na odlišná zimoviště.

Ve studii autorů Santiago-Alarcon et al. (2011) vliv migračního rozhraní na distribuci a prevalenci parazitů zkoumán byl, ale ani zde nedošlo k prokázání tohoto vlivu. Důvodem může být fakt, že k formování migračního rozhraní došlo u tohoto ptáka poměrně nedávno.

Nakonec jsme výsledky naší studie porovnali ještě s výzkumem autorů Rönn et al., (2015). Zatímco v naší studii jsme vliv migračního rozhraní potvrdili rozdílnou přítomností parazitických linií u různě migrujících skupin ptáků, v jejich studii k žádnému takovému závěru nedospěli. Diverzita malárií byla podobná u všech zkoumaných populací nacházejících se na migračním rozhraní. Nalezené rozdíly byly pouze mezi hodnotami prevalence. Tento rozdíl může být zapříčiněn tím, že v naší studii bylo analyzováno větší množství vzorků, které pocházely z dost rozdílných lokalit.

5.3.2 Prevalence a parazitické linie v různých letech na lokalitách v Čechách

Měli jsme možnost srovnat hodnoty prevalence získané během let 2010 – 2013 u populace vlaštovek z různých lokalit v Čechách. Bylo zaznamenáno, že se prevalence během let výzkumu měnila. Celková hodnota prevalence během let pomalu rostla (od 9,4% v roce 2010 až po 24,2% v roce 2013). Stejný trend byl zaznamenán i mezi samci a samicemi. U některých jedinců, kteří byli v naší studii chyceni opakovaně během let, docházelo ke změnám ve složení parazitické fauny, nebo k jejich úplné ztrátě, jak ukazuje Tabulka 7.

Taková změna v prevalenci nemusí být striktně zapříčiněná vyléčením jedinců z infekce, ale může být dána chronickou fází onemocnění. Tato fáze nákazy bývá dlouhá a malárie jsou v této době pod kontrolou imunitního systému (Snounou et al., 1989). Nemusí tak dojít k jejich úspěšné detekci a vzorek může být mylně označen jako negativní (Asghar et al., 2011).

Na druhou stranu molekulární metody, které byly použité i v naší studii, nejsou schopné rozlišit typ vývojového stádia parazita ve studovaném vzorku (Njabo et al., 2011; Valkiūnas, 2011) a říci, zda nešlo pouze o náhodný přenos. Na ptáku mohl sát vektor, který byl infekční a mohlo dojít i k přenosu malárií, ale infikovaný pták nemusí být pro tyto parazity vhodným mezipřevzatkem. Malárie pak nejsou schopny se dále vyvíjet a k propuknutí onemocnění nedojde (Valkiūnas, 2011).

5.4 Vliv malárií na kondici, fitness a sekundární pohlavní znaky u vlaštovek

U vlaštovky obecné byla objevena souvislost mezi reprodukčním úspěchem samců a jejich fenotypem (Møller, 1988; Saino et al., 1977; Safran & McGraw, 2004; Michálková, 2012). Zatímco většina studií na evropském poddruhu prokázala vztah mezi délkou rýdovacích per a reprodukčním úspěchem samců (Møller, 1988; Saino et al., 1977), na severoamerickém poddruhu korelovalo s úspěchem v rozmnožování ventrální zbarvení těla (Safran & McGraw, 2004). Ventrální zbarvení hrálo roli v rozmnožování také u japonské populace vlaštovek (Hasegawa et al., 2014), a zde se navíc objevil i pozitivní vztah s bílými vzory na ocasních perech (Hasegawa & Arai, 2013).

Podle Hamiltona a Zukové (1982) by exprese samčích sekundárních pohlavních znaků mohla být ovlivňována parazity. Sekundární pohlavní znaky by měly být spolehlivým ukazatelem zdraví a celkové kvality kondice u samců. Samice by si tak měly vybírat partnery na základě kvality těchto znaků. Platnost teorie otestovala již řada studií, výsledky jsou ale zatím stále nejednoznačné. Některé výzkumy sice potvrdily hypotézu těchto dvou autorů (Møller & Saino, 1994; Brawn et al., 2000; Scheuerlein & Ricklefs, 2004; Garamszegi, 2005), ale najde se i plno prací, které dospěly k zcela opačným závěrům (Sol et al., 2000; Bensch et al., 2007; Szöllösi et al., 2009; Jacquin et al., 2001).

V další části naší studie jsme se tedy zabývali otázkou, zda mohou malárie ovlivňovat kondici, fitness nebo sekundární pohlavní znaky u vlaštovek. K analýze jsme použili vzorky pocházejících z Čech. V jednotlivých modelech bylo postupně testováno několik proměnných a u téměř žádné z nich nebyl prokázán signifikantní vliv parazitů.

Oproti očekávání, že nakažení samci budou vykazovat horší sytost opeření, jelikož právě peří z ventrální oblasti se uplatňuje jako sekundární sexuální znak u tohoto ptačího druhu, vyšel průkazný vliv malárií na jednu z naměřených hodnot pro odstín peří u samic ($P = 0.0331^*$). Slabě nad průkazností byl u samic také vztah pro délku pravého rýdovacího pera.

Vliv malárií nebyl potvrzen ani v reprodukčním úspěchu v prvním hnízdění, ani u celkového reprodukčního úspěchu jak pro samce, tak pro samice. Ačkoliv se může zdát, že vliv malárií na fitness u ptáků je zřejmý, tento negativní vztah nebyl vždy potvrzen (Bensch et al., 2007; Ortego et al., 2008; Szöllösi et al., 2009). Výsledky studie autorů Marzal et al. (2008), které byly získány u populace jiříček obecných (*Delichon urbica*), sice potvrdily snížení tělesné hmotnosti a zvýšení počtu ektoparazitů, ale jen u jedinců

nakažených dvěma malarickými liniemi najednou. Překvapivě tito jedinci měli i větší reprodukční úspěch než jedinci zcela zdraví. Je tedy možné, že onemocnění způsobené jen jednou parazitickou linií nemá vliv na fitness u vlaštovky stejně, jako u jiříček ve studii od Marzal et al. (2008).

Jako poslední byl testován vztah mezi prevalencemi parazitů u vlaštovek na lokalitách Kotrba a Šaloun, a potom mezi prevalencemi a jednotlivými pohlavími. Ani zde nevyšel žádný průkazný rozdíl mezi prevalencemi.

6 Závěr

Hodnoty prevalence se na jednotlivých lokalitách pohybovaly v rozmezí 19,3% - 0%. Celková zjištěná prevalence je nejvyšší u ptáků z Čech (19,3%) a nejnižší hodnoty jsou u sedentárních populací v Izraeli a na Taiwanu (0%). Z celkem 24 detekovaných linií patří do rodu *Haemoproteus* 8 linií a do rodu *Plasmodium* 16 linií. Nejvíce infekcí je tedy u vlaštovek způsobeno právě rodem *Plasmodium*. Poměrně veliký počet detekovaných linií u vlaštovek odpovídá faktu, že se jedná v převážné většině o migrující druh na dlouhé vzdálenosti. Sedentárních populací je u tohoto druhu o dost méně a podle našich výsledků nejsou nakaženy maláriemi.

U populací využívajících odlišné migrační cesty, tzv. západní a východní, byly zaznamenány rozdíly ve složení parazitických linií. Tyto rozdíly ale mohou být způsobeny i odlišnými lokalitami na zimovištích a jejich rozdílnými podmínkami.

U převážné většiny detekovaných parazitických linií dochází pravděpodobně k přenosu na zimovištích v Africe. U některých parazitů může ale docházet k přenosu jak na lokalitách v Evropě, tak i na lokalitách v Africe. Tyto malárie byly totiž detekovány jak u ptáků migrujících, tak i u afrických a evropských residentů.

U severoamerické populace vlaštovek byly detekovány linie, které již byly známy z jiných druhů amerických ptáků, v převážné většině u residentů pocházejících z Jižní Ameriky. Jedna ze zachycených linií byla určena úplně poprvé. Žádná ze zjištěných linií v Americe se nevyskytuje v Evropě. Můžeme tedy usuzovat, že vlaštovky při kolonizaci nových území v Americe zanechaly své původní parazity v Evropě a místo nich přijaly tamní parazitickou faunu.

Hodnoty prevalence se na různých lokalitách v Čechách v rozmezí let 2010 – 2013 měnily. Celková hodnota prevalence během let pomalu rostla (od 9,4% v roce 2010 až po 24,2% v roce 2013) a podobný trend byl zaznamenán i mezi samci a samicemi. U některých jedinců, kteří byli opětovně ovzorkováni během několika let, docházelo ke změnám ve složení parazitů, nebo k jejich úplné ztrátě. Takoví jedinci se nemuseli úplně vyléčit, ale mohli se nacházet v chronické fázi onemocnění, kdy jsou malárie pod kontrolou imunity.

Při testování vlivu malárií na kondici, fitness a sekundární pohlavní znaky u ptáků z Čech nebyl prokázán žádný signifikantní vztah. V jednotlivých modelech bylo postupně testováno několik proměnných (věk, rok, lokalita, pohlaví, objem hlavy, délka křídla a tarsu, tělesná hmotnost, fitness získaná během prvního hnízdění, celková fitness, délka

pravého ocasního pera a sytost peří) a u téměř žádné z nich nebyl prokázán signifikantní vliv parazitů. Průkazně vyšel jen vliv na jednu z naměřených hodnot pro odstín peří u samic. Slabě nad průkazností u tohoto pohlaví vyšel také vztah pro délku pravého rýdovacího pera.

Rozdíl mezi prevalencemi jednotlivých parazitických linií na lokalitách Kotrba a Šaloun v Čechách také průkazně nevyšel. Podobně tomu bylo i v případě samců a samic. Ani zde nevyšel průkazný výsledek, že by se prevalence mezi těmito dvěma pohlavími nějak významně lišila.

7 Literatura

- Able, K. P., & Belthoff, J. R. (1998).** Rapid 'evolution' of migratory behaviour in the introduced house finch of eastern North America. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 265(1410), 2063-2071.
- Alerstam, T., Hedenström, A., & Åkesson, S. (2003).** Long-distance migration: evolution and determinants. *Oikos*, 103(2), 247-260.
- Ambrosini, R., Møller, A. P., & Saino, N. (2009).** A quantitative measure of migratory connectivity. *Journal of Theoretical Biology*, 257(2), 203-211.
- Argilla, L. S., Howe, L., Gartrell, B. D., & Alley, M. R. (2013).** High prevalence of *Leucocytozoon* spp. in the endangered yellow-eyed penguin (*Megadyptes antipodes*) in the sub-Antarctic regions of New Zealand. *Parasitology*, 140(05), 672-682.
- Asghar, M., Westerdahl, H., Zehtindjiev, P., Ilieva, M., Hasselquist, D., & Bensch, S. (2012).** Primary peak and chronic malaria infection levels are correlated in experimentally infected great reed warblers. *Parasitology*, 139(10), 1246-1252.
- Asghar, M., Hasselquist, D., & Bensch, S. (2011).** Are chronic avian haemosporidian infections costly in wild birds?. *Journal of Avian Biology*, 42(6), 530-537.
- Atkinson, C. T., Dusek, R. J., Woods, K. L., & Iko, W. M. (2000).** Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. *Journal of Wildlife Diseases*, 36, 197-204.
- Ballard, G., Geupel, G. R., Nur, N., & Gardali, T. (2003).** Long-term declines and decadal patterns in population trends of songbirds in western North America, 1979-1999. *The Condor*, 105(4), 737-755.
- Bell, C. P. (2000).** Process in the evolution of bird migration and pattern in avian ecogeography. *Journal of Avian Biology*, 258-265.
- Bensch, S., Waldenström, J., Jonzén, N., Westerdahl, H., Hansson, B., Sejberg, D., & Hasselquist, D. (2007).** Temporal dynamics and diversity of avian malaria parasites in a single host species. *Journal of Animal Ecology*, 76(1), 112-122.
- Bensch, S., & Åkesson, S. (2003).** Temporal and spatial variation of hematozoans in Scandinavian willow warblers.

- Bentz, S., Rigaud, T., Barroca, M., Martin-Laurent, F., Bru, D., Moreau, J., & Faivre, B. (2006).** Sensitive measure of prevalence and parasitaemia of haemosporidia from European blackbird (*Turdus merula*) populations: value of PCR-RFLP and quantitative PCR. *Parasitology*, 133(06), 685-692.
- Berthold, P. (1996).** Control of bird migration. *Springer Science & Business Media*.
- Berthold, P. (1999).** A comprehensive theory for the evolution, control and adaptability of avian migration. *Ostrich*, 70(1), 1-11.
- Berthold, P. (2001).** *Bird migration: a general survey* (Vol. 12). Oxford University Press.
- Berthold, P., & Pulido, F. (1994).** Heritability of migratory activity in a natural bird population. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 257(1350), 311-315.
- Borkhataria, R. R., Lawrence Bryan Jr, A., & Frederick, P. C. (2013).** Movements and Habitat Use by Fledgling Wood Storks (*Mycteria Americana*) Prior to Dispersal from the Natal Colony. *Waterbirds*, 36(4), 409-417.
- Brawner, W. R., Hill, G. E., & Sundermann, C. A. (2000).** Effects of coccidial and mycoplasmal infections on carotenoid-based plumage pigmentation in male house finches. *The Auk*, 117(4), 952-963.
- Crawley, M. J. (2007).** The R book. Chichester. UK: Wiley.
- Dor, R., Safran, R. J., Sheldon, F. H., Winkler, D. W., & Lovette, I. J. (2010).** Phylogeny of the genus *Hirundo* and the Barn Swallow subspecies complex. *Molecular phylogenetics and evolution*, 56(1), 409-418.
- Drovetski, S. V., Aghayan, S. A., Mata, V. A., Lopes, R. J., Mode, N. A., Harvey, J. A., & Voelker, G. (2014).** Does the niche breadth or trade-off hypothesis explain the abundance–occupancy relationship in avian Haemosporidia?. *Molecular ecology*, 23(13), 3322-3329.
- Durrant, K. L., Marra, P. P., Fallon, S. M., Colbeck, G. J., Gibbs, H. L., Hobson, K. A., Norris, D. R., Bernik, B., Lloyd, V. L. & Fleischer, R. C. (2008).** Parasite assemblages distinguish populations of a migratory passerine on its breeding grounds. *Journal of Zoology*, 274(4), 318-326.

Cepák, J. (2008). *Atlas migrace ptáků: české a Slovenské republiky*. Aventinum.

Chamberlain, C. P., Bensch, S., Feng, X., Åkesson, S., & Andersson, T. (2000). Stable isotopes examined across a migratory divide in Scandinavian willow warblers (*Phylloscopus trochilus trochilus* and *Phylloscopus trochilus acredula*) reflect their African winter quarters. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 267(1438), 43-48.

Chevallier, D., Le Maho, Y., Brossault, P., Baillon, F., & Massemin, S. (2011). The use of stopover sites by Black Storks (*Ciconia nigra*) migrating between West Europe and West Africa as revealed by satellite telemetry. *Journal of Ornithology*, 152(1), 1-13.

Cramp, S., & Brooks, D. J. (1988). Handbook of the birds of Europe, the Middle East and North Africa. The birds of the western Palearctic, vol. 5. Tyrant Flycatchers to Thrushes.

Darwin, C. (1871). The Descent of Man and Selection in Relation to Sex. Academic Press.

Del Cerro, S., Merino, S., Martínez-de la Puente, J., Lobato, E., Ruiz-de-Castañeda, R., Rivero-de Aguilar, J., & Moreno, J. (2010). Carotenoid-based plumage colouration is associated with blood parasite richness and stress protein levels in blue tits (*Cyanistes caeruleus*). *Oecologia*, 162(4), 825-835.

De Laet, J., & Summers-Smith, J. D. (2007). The status of the urban house sparrow *Passer domesticus* in north-western Europe: a review. *Journal of Ornithology*, 148(2), 275-278.

Donald, P. F., Green, R. E., & Heath, M. F. (2001). Agricultural intensification and the collapse of Europe's farmland bird populations. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 268(1462), 25-29.

Dunn, E. H., Hobson, K. A., Wassenaar, L. I., Hussell, D., & Allen, M. L. (2006). Identification of summer origins of songbirds migrating through southern Canada in Autumn. *Avian Conservation Ecology* 1: 4.

Durrant, K. L., Marra, P. P., Fallon, S. M., Colbeck, G. J., Gibbs, H. L., Hobson, K. A., ... & Fleischer, R. C. (2008). Parasite assemblages distinguish populations of a migratory passerine on its breeding grounds. *Journal of Zoology*, 274(4), 318-326.

- Durrant, K. L., Reed, J. L., Jones, P. J., Dallimer, M., Cheke, R. A., McWilliam, A. N., & Fleischer, R. C. (2007).** Variation in haematozoan parasitism at local and landscape levels in the red-billed quelea *Quelea quelea*. *Journal of Avian Biology*, 38(6), 662-671.
- Fallon, S. M., Bermingham, E., & Ricklefs, R. E. (2005).** Host specialization and geographic localization of avian malaria parasites: a regional analysis in the Lesser Antilles. *The American Naturalist*, 165(4), 466-480.
- Fallon, S. M., Fleischer, R. C., & Graves, G. R. (2006).** Malarial parasites as geographical markers in migratory birds?. *Biology Letters*, 2(2), 213-216.
- Ferrell, S. T., Snowden, K., Marlar, A. B., Garner, M., & Lung, N. P. (2007).** Fatal hemoprotozoal infections in multiple avian species in a zoological park. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 38(2), 309-316.
- Garamszegi, L. Z. (2005).** Bird song and parasites. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 59(2), 167-180.
- Garamszegi, L. Z., & Møller, A. P. (2012).** The interspecific relationship between prevalence of blood parasites and sexual traits in birds when considering recent methodological advancements. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 66(1), 107-119.
- Garvin, M. C., Szell, C. C., & Moore, F. R. (2006).** Blood parasites of Nearctic-Neotropical migrant passerine birds during spring trans-gulf migration: Impact on host body condition. *Journal of Parasitology*, 92(5), 990-996.
- Graves, G. R., Romanek, C. S., & Navarro, A. R. (2002).** Stable isotope signature of philopatry and dispersal in a migratory songbird. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(12), 8096-8100.
- Hamilton, W. D., & Zuk, M. (1982).** Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites?. *Science*, 218(4570), 384-387.
- Hasegawa, M., & Arai, E. (2013).** Divergent tail and throat ornamentation in the barn swallow across the Japanese islands. *Journal of ethology*, 31(1), 79-83.
- Hasegawa, M., Arai, E., Watanabe, M., & Nakamura, M. (2014).** Colourful males hold high quality territories but exhibit reduced paternal care in barn swallows. *Behaviour*, 151(5), 591-612.

- Helbig, A. (1996).** Genetic basis, mode of inheritance and evolutionary changes of migratory directions in palaeartic warblers (Aves: Sylviidae). *The Journal of experimental biology*, 199(1), 49-55.
- Hellgren, O., Križanauskiene, A., Valkiūnas, G., & Bensch, S. (2007).** Diversity and phylogeny of mitochondrial cytochrome B lineages from six morphospecies of avian Haemoproteus (Haemosporida: Haemoproteidae). *Journal of Parasitology*, 93(4), 889-896.
- Hellgren, O., Waldenström, J., & Bensch, S. (2004).** A new PCR assay for simultaneous studies of Leucocytozoon, Plasmodium, and Haemoproteus from avian blood. *Journal of Parasitology*, 90(4), 797-802.
- Hewitt, G. M. (1996).** Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological journal of the Linnean Society*, 58(3), 247-276.
- Hewitt, G. (2000).** The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405(6789), 907-913.
- Hobson, K. A., Aubry, Y., & Wassenaar, L. I. (2004).** Migratory connectivity in Bicknell's Thrush: Locating missing populations with hydrogen isotopes. *The Condor*, 106(4), 905-909.
- Inger, R., Gregory, R., Duffy, J. P., Stott, I., Voříšek, P., & Gaston, K. J. (2015).** Common European birds are declining rapidly while less abundant species' numbers are rising. *Ecology letters*, 18(1), 28-36.
- Irwin, D. E., & Irwin, J. H. (2005).** Siberian migratory divides: The role of seasonal migration in speciation. *Birds of two worlds: the ecology and evolution of migration*, 27-40.
- Jacquín, L., Lenouvel, P., Haussy, C., Ducatez, S., & Gasparini, J. (2011).** Melanin-based coloration is related to parasite intensity and cellular immune response in an urban free living bird: the feral pigeon *Columba livia*. *Journal of Avian biology*, 42(1), 11-15.
- James, H. F. (2005).** Paleogene fossils and the radiation of modern birds. *The Auk*, 122(4), 1049-1054.

- Jarvis, E. D., Mirarab, S., Aberer, A. J., Li, B., Houde, P., Li, C., ... & Samaniego, J. A. (2014).** Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. *Science*, 346(6215), 1320-1331.
- Jetz, W., Thomas, G. H., Joy, J. B., Redding, D. W., Hartmann, K., & Mooers, A. O. (2014).** Global distribution and conservation of evolutionary distinctness in birds. *Current Biology*, 24(9), 919-930.
- Keyser, A. J., & Hill, G. E. (2000).** Structurally based plumage coloration is an honest signal of quality in male blue grosbeaks. *Behavioral Ecology*, 11(2), 202-209.
- Kimura, M., Clegg, S. M., Lovette, I. J., Holder, K. R., Girman, D. J., Milá, B., Wade, P. & Smith, T. B. (2002).** Phylogeographical approaches to assessing demographic connectivity between breeding and overwintering regions in a Nearctic–Neotropical warbler (*Wilsonia pusilla*). *Molecular Ecology*, 11(9), 1605-1616.
- Kleven, O., Jacobsen, F., Izadnegahdar, R., Robertson, R. J., & Lifjeld, J. T. (2006).** Male tail streamer length predicts fertilization success in the North American barn swallow (*Hirundo rustica erythrogaster*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 59(3), 412-418.
- Knowles, S. C., Wood, M. J., Alves, R., Wilkin, T. A., Bensch, S., & Sheldon, B. C. (2011).** Molecular epidemiology of malaria prevalence and parasitaemia in a wild bird population. *Molecular Ecology*, 20(5), 1062-1076.
- Knowles, S. C. L., Palinauskas, V., & Sheldon, B. C. (2010a).** Chronic malaria infections increase family inequalities and reduce parental fitness: experimental evidence from a wild bird population. *Journal of evolutionary biology*, 23(3), 557-569.
- Knowles, S. C., Wood, M. J., & Sheldon, B. C. (2010b).** Context-dependent effects of parental effort on malaria infection in a wild bird population, and their role in reproductive trade-offs. *Oecologia*, 164(1), 87-97.
- Kose, M., & Møller, A. P. (1999).** Sexual selection, feather breakage and parasites: the importance of white spots in the tail of the barn swallow (*Hirundo rustica*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 45(6), 430-436.

- Lachish, S., Knowles, S. C., Alves, R., Wood, M. J., & Sheldon, B. C. (2011).** Fitness effects of endemic malaria infections in a wild bird population: the importance of ecological structure. *Journal of Animal Ecology*, 80(6), 1196-1206.
- Lifjeld, J. T., Kleven, O., Jacobsen, F., McGraw, K. J., Safran, R. J., & Robertson, R. J. (2011).** Age before beauty? Relationships between fertilization success and age-dependent ornaments in barn swallows. *Behavioral ecology and sociobiology*, 65(9), 1687-1697.
- Lovette, I. J., Clegg, S. M., & Smith, T. B. (2004).** Limited utility of mtDNA markers for determining connectivity among breeding and overwintering locations in three Neotropical migrant birds. *Conservation Biology*, 18(1), 156-166.
- MacDougall, A. K., & Montgomerie, R. (2003).** Assortative mating by carotenoid-based plumage colour: a quality indicator in American goldfinches, *Carduelis tristis*. *Naturwissenschaften*, 90(10), 464-467.
- Maia R., Eliason C.M., Bitton P.P., Doucet S.M. and Shawkey M.D. (2013).** pavo: an R package for the analysis, visualization and organization of spectral data. *Methods in Ecology and Evolution* 4: 906-913.
- Maguire, S. E., & Safran, R. J. (2010).** Morphological and genetic predictors of parental care in the North American barn swallow *Hirundo rustica erythrogaster*. *Journal of Avian Biology*, 41(1), 74-82.
- Martell, M. S., Henny, C. J., Nye, P. E., & Solensky, M. J. (2001).** Fall migration routes, timing, and wintering sites of North American Ospreys as determined by satellite telemetry. *The Condor*, 103(4), 715-724.
- Martínez, M. M. (1983).** Nidificación de *Hirundo rustica erythrogaster* (Boddaert) en la Argentina (Aves, Hirundinidae). *Neotropica*, 29(81), 83-86.
- Marzal, A., Ricklefs, R. E., Valkiūnas, G., Albayrak, T., Arriero, E., Bonneaud, C., ... & Bensch, S. (2011).** Diversity, loss, and gain of malaria parasites in a globally invasive bird. *PLoS One*, 6(7), e21905.
- Marzal, A., Bensch, S., Reviriego, M., Balbontin, J., & De Lope, F. (2008).** Effects of malaria double infection in birds: one plus one is not two. *Journal of evolutionary biology*, 21(4), 979-987.

- Marzal, A., De Lope, F., Navarro, C., & Møller, A. P. (2005).** Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. *Oecologia*, 142(4), 541-545.
- McGraw, K. J., Safran, R. J., Evans, M. R., & Wakamatsu, K. (2004).** European barn swallows use melanin pigments to color their feathers brown. *Behavioral Ecology*, 15(5), 889-891.
- McKinnon, E. A., Fraser, K. C., & Stutchbury, B. J. (2013).** New discoveries in landbird migration using geolocators, and a flight plan for the future. *The Auk*, 130(2), 211-222.
- Micháľková, R. (2012).** Mimopárové paternity a síla pohlavního výběru u vlaštovky obecné. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha.
- Møller, A. P. (1988).** Female choice selects for male sexual tail ornaments in the monogamous swallow. *Nature*, 332(6165), 640-642.
- Møller, A. P. (1993a).** Patterns of fluctuating asymmetry in sexual ornaments predict female choice. *Journal of Evolutionary Biology*, 6(4), 481-491.
- Møller, A. P. (1993b).** Female preference for apparently symmetrical male sexual ornaments in the barn swallow *Hirundo rustica*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 32(6), 371-376.
- Møller, A. P., & Saino, N. (1994).** Parasites, immunology of hosts, and host sexual selection. *The Journal of parasitology*, 850-858.
- Møller, A. P., Brohede, J., Cuervo, J. J., De Lope, F., & Primmer, C. (2003).** Extrapair paternity in relation to sexual ornamentation, arrival date, and condition in a migratory bird. *Behavioral Ecology*, 14(5), 707-712.
- Møller, A. P., & Nielsen, J. T. (2007).** Malaria and risk of predation: a comparative study of birds. *Ecology*, 88(4), 871-881.
- Møller, A. P., Garamszegi, L. Z., Peralta-Sánchez, J. M., & Soler, J. J. (2011).** Migratory divides and their consequences for dispersal, population size and parasite–host interactions. *Journal of evolutionary biology*, 24(8), 1744-1755.

- Njabo, K. Y., Cornel, A. J., Bonneaud, C., Toffelmier, E., Sehgal, R. N. M., Valkiūnas, G., & Smith, T. B. (2011).** Nonspecific patterns of vector, host and avian malaria parasite associations in a central African rainforest. *Molecular Ecology*, 20(5), 1049-1061.
- Ortego, J., Cordero, P. J., Aparicio, J. M., & Calabuig, G. (2008).** Consequences of chronic infections with three different avian malaria lineages on reproductive performance of Lesser Kestrels (*Falco naumanni*). *Journal of Ornithology*, 149(3), 337-343.
- Outlaw, D. C., Voelker, G., Mila, B., & Girman, D. J. (2003).** Evolution of long-distance migration in and historical biogeography of *Catharus* thrushes: a molecular phylogenetic approach. *The Auk*, 120(2), 299-310.
- Pagenkopp, K. M., Klicka, J., Durrant, K. L., Garvin, J. C., & Fleischer, R. C. (2008).** Geographic variation in malarial parasite lineages in the common yellowthroat (*Geothlypis trichas*). *Conservation Genetics*, 9(6), 1577-1588.
- Palinauskas, V., Valkiūnas, G., Bolshakov, C. V., & Bensch, S. (2008).** *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): effects on experimentally infected passerine birds. *Experimental parasitology*, 120(4), 372-380.
- Pérez-Tris, J., Hasselquist, D., Hellgren, O., Križanauskiene, A., Waldenström & J.Bensch, S. (2005).** What are malaria parasites? *Trends in Parasitology*, 21, 209-211.
- Pérez-Tris, J., Hallgren, O., Križanauskiene, A., Walderström, J., Secondi, J., Bonneaud, C., Fjeldsa, J., Hasselquist, D. & Bensch, S. (2007).** Within-host speciation of malaria parasites. *PLoS One*, 2(2).
- Petrželková, A., Micháľková, R., Albrechtová, J., Cepák, J., Honza, M., Kreisinger, J., ... & Albrecht, T. (2015).** Brood parasitism and quasi-parasitism in the European barn swallow *Hirundo rustica rustica*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 1-10.
- Pulido, F. (2007).** The genetics and evolution of avian migration. *Bioscience*, 57(2), 165-174.
- Pulido, F., & Berthold, P. (2004).** Microevolutionary response to climatic change. *Advances in Ecological Research*, 35, 151-183.

- Pulido, F., Berthold, P., & Van Noordwijk, A. J. (1996).** Frequency of migrants and migratory activity are genetically correlated in a bird population: evolutionary implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(25), 14642-14647.
- Rappole, J. H., & Jones, P. (2003).** Evolution of old and new world migration systems. *Ardea*, 90(3), 525-537.
- R Core Team (2014).** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Ricklefs, R. E., Swanson, B. L., Fallon, S. M., Martínez-Abraín, A., Scheuerlein, A., Gray, J., & Latta, S. C. (2005).** Community relationships of avian malaria parasites in southern Missouri. *Ecological Monographs*, 75(4), 543-559.
- Rolshausen, G., Segelbacher, G., Hobson, K. A., & Schaefer, H. M. (2009).** Contemporary evolution of reproductive isolation and phenotypic divergence in sympatry along a migratory divide. *Current Biology*, 19(24), 2097-2101.
- Rönn, J. A. C., Harrod, C., Bensch, S., & Wolf, J. B. (2015).** Transcontinental migratory connectivity predicts parasite prevalence in breeding populations of the European barn swallow. *Journal of evolutionary biology*, 28(3), 535-546.
- Rubenstein, D. R., Chamberlain, C. P., Holmes, R. T., Ayres, M. P., Waldbauer, J. R., Graves, G. R., & Tuross, N. C. (2002).** Linking breeding and wintering ranges of a migratory songbird using stable isotopes. *Science*, 295(5557), 1062-1065.
- Safran, R. J., & McGraw, K. J. (2004).** Plumage coloration, not length or symmetry of tail-streamers, is a sexually selected trait in North American barn swallows. *Behavioral Ecology*, 15(3), 455-461.
- Safran, R. J., Neuman, C. R., McGraw, K. J., & Lovette, I. J. (2005).** Dynamic paternity allocation as a function of male plumage color in barn swallows. *Science*, 309(5744), 2210-2212.

- Saino, N., Szep, T., Romano, M., Rubolini, D., Spina, F., & Møller, A. P. (2004).** Ecological conditions during winter predict arrival date at the breeding quarters in a trans-Saharan migratory bird. *Ecology letters*, 7(1), 21-25.
- Saino, N., Stradi, R., Ninni, P., Pini, E., & Møller, A. P. (1999).** Carotenoid plasma concentration, immune profile, and plumage ornamentation of male barn swallows (*Hirundo rustica*). *The American Naturalist*, 154(4), 441-448.
- Saino, N., Primmer, C. R., Ellegren, H., & Møller, A. P. (1997).** An experimental study of paternity and tail ornamentation in the barn swallow (*Hirundo rustica*). *Evolution*, 562-570.
- Salewski, V., & Bruderer, B. (2007).** The evolution of bird migration – a synthesis. *Naturwissenschaften*, 94(4), 268-279.
- Santiago-Alarcon, D., Bloch, R., Rolshausen, G., Schaefer, H. M., & Segelbacher, G. (2011).** Prevalence, diversity, and interaction patterns of avian haemosporidians in a four-year study of blackcaps in a migratory divide. *Parasitology*, 138(07), 824-835.
- Scheuerlein, A., & Ricklefs, R. E. (2004).** Prevalence of blood parasites in European passeriform birds. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 271(1546), 1363-1370.
- Sillett, T. S., & Holmes, R. T. (2002).** Variation in survivorship of a migratory songbird throughout its annual cycle. *Journal of Animal Ecology*, 71(2), 296-308.
- Smith, H. G., Ryegård, A., & Svensson, S. (2012).** Is the large-scale decline of the starling related to local changes in demography?. *Ecography*, 35(8), 741-748.
- Smith, H. G., Montgomerie, R., Poldmaa, T., White, B. N., & Boag, P. T. (1991).** DNA fingerprinting reveals relation between tail ornaments and cuckoldry in barn swallows. *Behav. Ecol*, 2, 90-98.
- Snounou, G., Jarra, W., Viriyakosol, S., Wood, J. C., & Brown, K. N. (1989).** Use of a DNA probe to analyse the dynamics of infection with rodent malaria parasites confirms that parasite clearance during crisis is predominantly strain-and species-specific. *Molecular and biochemical parasitology*, 37(1), 37-46.

- Sol, D., Jovani, R., & Torres, J. (2000).** Geographical variation in blood parasites in feral pigeons: the role of vectors. *Ecography*, 307-314.
- Synek, P., Albrecht, T., Vinkler, M., Schnitzer, J., Votýpka, J., & Munclinger, P. (2013).** Haemosporidian parasites of a European passerine wintering in South Asia: diversity, mixed infections and effect on host condition. *Parasitology research*, 112(4), 1667-1677.
- Szöllősi, E., Rosivall, B., Hasselquist, D., & Török, J. (2009).** The effect of parental quality and malaria infection on nestling performance in the collared flycatcher (*Ficedula albicollis*). *Journal of Ornithology*, 150(3), 519-527.
- Tankersley Jr, R., & Orvis, K. (2003).** Modeling the geography of migratory pathways and stopover habitats for neotropical migratory birds. *Conservation Ecology*, 7(1), 7.
- Valkiūnas, G. (2011).** Haemosporidian vector research: marriage of molecular and microscopical approaches is essential. *Molecular Ecology*, 20(15), 3084-3086.
- Valkiūnas, G. (2005).** Avian malaria parasites and other haemosporidia: CRC Press.
- Valkiūnas G., Atkinson C. T., Bensch S., Sehgal R. N., Ricklefs R. E. (2008).** Parasite misidentifications in GenBank: how to minimize their number? *Trends in Parasitology* 24, 247-8.
- Valkiūnas, G., Križanauskienė, A., Iezhova, T. A., Hellgren, O., & Bensch, S. (2007).** Molecular phylogenetic analysis of circumnuclear hemoproteids (Haemosporida: Haemoproteidae) of sylviid birds, with a description of *Haemoproteus parabelopolskyi* sp. nov. *Journal of Parasitology*, 93(3), 680-687.
- Valkiūnas, G., Anwar, A. M., Atkinson, C. T., Greiner, E. C., Paperna, I., & Peirce, M. A. (2005).** What distinguishes malaria parasites from other pigmented haemosporidians?. *Biol*, 70, 849-860.
- Vortman, Y., Lotem, A., Dor, R., Lovette, I. J., & Safran, R. J. (2011).** The sexual signals of the East-Mediterranean barn swallow: a different swallow tale. *Behavioral Ecology*, 22(6), 1344-1352.

- Votýpka, J., Šimek, J., & Tryjanowski, P. (2003).** Blood parasites, reproduction and sexual selection in the red-backed shrike (*Lanius collurio*). *Annales Zoologici Fennici*, 40, 431-439.
- Waldenström, J., Bensch, S., Kiboi, S., Hasselquist, D., & Ottosson, U. (2002).** Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. *Molecular Ecology*, 11(8), 1545-1554.
- Webster, M. S., Marra, P. P., Haig, S. M., Bensch, S., & Holmes, R. T. (2002).** Links between worlds: unraveling migratory connectivity. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(2), 76-83.
- Westerdahl, H., Waldenström, J., Hansson, B., Hasselquist, D., von Schantz, T., & Bensch, S. (2005).** Associations between malaria and MHC genes in a migratory songbird. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 272(1571), 1511-1518.
- Wood, M. J., Cosgrove, C. L., Wilkin, T. A., Knowles, S. C., Day, K. P., & Sheldon, B. C. (2007).** Within-population variation in prevalence and lineage distribution of avian malaria in blue tits, *Cyanistes caeruleus*. *Molecular Ecology*, 16(15), 3263-3273.
- Yohannes, E., Križanauskienė, A., Valcu, M., Bensch, S., & Kempenaers, B. (2009).** Prevalence of malaria and related haemosporidian parasites in two shorebird species with different winter habitat distribution. *Journal of Ornithology*, 150(1), 287-291.
- Zink, R. M., Pavlova, A., Rohwer, S., & Drovetski, S. V. (2006).** Barn swallows before barns: population histories and intercontinental colonization. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 273(1591), 1245-1251.

8 Přílohy

Parazitická linie	Parazitický rod	Nakažené ptačí rody	Pravděpodobné místo nákazy
ACCTAC01	<i>Plasm</i>	<i>Tockus, Merops, Accipiter, Crex, Mirafra, Oriolus, Ficedula, Fraseria, Ploceus, Bleda, Alethe, Neocossyphus, Zoothera, Dyaphorophya, Campethera, Sturnidae</i>	Afrika
CRYRE01	<i>Haem</i>	<i>Cryptospiza</i>	Afrika
CYAOLI02	<i>Plasm</i>	<i>Cyanomitra</i>	Afrika
DENPET03	<i>Plasm</i>	<i>Alopochen, Formicivora, Thryothorus, Coereba, Volatinia, Zonotrichia, Cranioleuca, Riparia, Cacicus, Dolichonyx, Gnorimopsar, Trichothraupis, Basileuterus, Geothlypis, Parula, Setophaga, Passer, Turdus, Pachyrhamphus, Vireo, Diopsittaca</i>	Jižní Amerika
GRW02	<i>Plasm</i>	<i>Philomachus, Carduelis, Loxia, Delichon, Quela, Acrocephalus, Hippolais, Phylloscopus, Sylvia, Hirundo</i>	Afrika i Evropa
GRW09	<i>Plasm</i>	<i>Camaroptera, Dicrurus, Rhipidura, Estrilda, Pyrenestes, Spermothaga, Uraeginthus, Serinus, Delichon, Hirundo, Psalidoprocne, Lanius, Cossypha, Ficedula, Muscicapa, Pogonocichla, Cinnyris, Cyanomitra, Deleornis, Hedydipna, Chalcomitra, Nectarinia, Gymnoris, Batis, Malimbus, Ploceus, Quelea, Andropadus, Bleda, Criniger, Nicator</i>	Afrika
HIRUS02	<i>Haem</i>	<i>Hirundo</i>	Afrika i Evropa
HIRUS04	<i>Haem</i>	<i>Hirundo</i>	Afrika i Evropa
HIRUS05	<i>Haem</i>	<i>Hirundo</i>	Afrika i Evropa
HIRUS06	<i>Plasm</i>	<i>Hirundo</i>	Afrika i Evropa
LINOLI01	<i>Plasm</i>	<i>Cisticola, Linurgus, Serinus, Ficedula, Anthobaphes, Cyanomitra, Nectarinia, Promerops, Passer, Euplectes, Ploceus, Quelea, Phylloscopus, Morus, Hirundo</i>	Afrika
PADOM17	<i>Plasm</i>	<i>Passer, Tiaris, Dolichonyx</i>	Jižní Amerika
PARUS1	<i>Haem</i>	<i>Sylvia, Carpodacus, Emberiza, Pyrrhula, Hirundo, Ficedula, Cyanistes, Parus, Periparus, Poecile, Sitta, Hippolais, Panurus, Phylloscopus, Sylvia, Erithacus, Saxicola, Turdus</i>	Evropa

Tabulka 8: První část tabulky nakažených ptačích rodů, které byly uvedeny v databázi MalAvi, a pravděpodobného místa přenosu malárií.

Parazitická linie	Parazitický rod	Nakažené ptačí rody	Pravděpodobné místo nákazy
PSEGR101	<i>Plasm</i>	<i>Sarothrura, Cisticola, Cryptospiza, Serinus, Pseudhirundo, Cercotrichas, Pogonocichla, Nectarinia, Plocepasser, Batis, Andropadus, Pycnonotus, Alethe, Dendropicos, Hirundo</i>	Afrika
RFF1	<i>Plasm</i>	<i>Calamonastes, Cisticola, Heliolais, Lagonosticta, Pytilia, Uraeginthus, Ficedula, Myrmecocichla, Euplectes, Quelea, Pycnonotus, Turdus</i>	Afrika
SYBOR21	<i>Plasm</i>	<i>Hirundo, Sylvia</i>	Afrika i Evropa
WW2	<i>Haem</i>	<i>Crex, Ficedula, Cyanistes, Parus, Acrocephalus, Panurus, Phylloscopus, Sylvia, Erithacus, Luscinia, Saxicola, Jynx</i>	Evropa

Tabulka 9: Druhá část tabulky nakažených ptačích rodů, které byly uvedeny v databázi MalAvi, a pravděpodobného místa přenosu malárií.

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.7171	-0.7171	-0.7171	-0.5676	1.9521

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	-1.7444	0.2555	-6.828	8.61e-12 ***
FsexM	0.5174	0.2881	1.796	0.0725 .

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 449.93 on 442 degrees of freedom
Residual deviance: 446.49 on 441 degrees of freedom
AIC: 450.49

Number of Fisher Scoring iterations: 4

Tabulka 10: Výsledky binomického zobecněného lineárního modelu pro výpočet vlivu malárií na pohlaví, věk, lokalitu, rok a objem hlavy. Uveden je výsledný nejjednodušší model. Nebyl prokázán žádný vliv malárií na výše uvedené hodnoty.

```

Coefficients:
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept) -0.88737    0.37447   -2.37   0.0178 *
Nwing        -0.06260    0.03912   -1.60   0.1096
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

    Null deviance: 396.08  on 409  degrees of freedom
Residual deviance: 393.47  on 408  degrees of freedom
AIC: 397.47

Number of Fisher Scoring iterations: 4

```

Tabulka 11: Výsledky binomického zobecněného lineárního modelu pro výpočet vlivu malárií na délku křídla, tarsu a tělesnou hmotnost. Uveden je výsledný nejjednodušší model. Nebyl prokázán žádný vliv malárií na výše uvedené hodnoty.

```

Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-0.7698 -0.7184 -0.7085 -0.6709  1.7960

Coefficients:
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept) -1.25411    0.17952  -6.986 2.83e-12 ***
FIESS1       0.07240    0.13330   0.543   0.587
FIESSTOTAL  -0.04531    0.08820  -0.514   0.607
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

    Null deviance: 392.39  on 366  degrees of freedom
Residual deviance: 392.09  on 364  degrees of freedom
AIC: 398.09

Number of Fisher Scoring iterations: 4

```

Tabulka 12: Výsledky binomického zobecněného lineárního modelu pro výpočet vlivu malárií na fitness během prvního hnízdění a na celkovou fitness u samců. Uveden je výsledný nejjednodušší model. Nebyl prokázán žádný vliv malárií na výše uvedené hodnoty.

```

Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-0.7516  -0.5697  -0.4720  -0.4262   2.3403

Coefficients:
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)  -2.3530     0.4151  -5.668 1.45e-08 ***
FIESS1        0.3366     0.2098   1.605   0.109
FIESSTOTAL   -0.1311     0.1499  -0.874   0.382
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

    Null deviance: 147.96  on 189  degrees of freedom
Residual deviance: 144.56  on 187  degrees of freedom
AIC: 150.56

Number of Fisher Scoring iterations: 5

```

Tabulka 13: Výsledky binomického zobecněného lineárního modelu pro výpočet vlivu malárií na fitness během prvního hnízdění a na celkovou fitness u samic. Uveden je výsledný nejjednodušší model. Nebyl prokázán žádný vliv malárií na výše uvedené hodnoty.

```

Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-0.9287  -0.7989  -0.7628   1.5140   1.7784

Coefficients:
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)   -9.294     7.217  -1.288   0.198
Brachiev       9.694     8.444   1.148   0.251

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

    Null deviance: 378.86  on 326  degrees of freedom
Residual deviance: 377.53  on 325  degrees of freedom
AIC: 381.53

Number of Fisher Scoring iterations: 4

```

Tabulka 14: Výsledky binomického zobecněného lineárního modelu pro výpočet vlivu malárií na barvu peří u samců. Uveden je výsledný nejjednodušší model. Nebyl prokázán žádný vliv malárií na výše uvedené hodnoty. Získané hodnoty *theta* a *phi* odpovídají tradičnímu viditelnému, resp. UV odstínu, zatímco *r-achieved* vyjadřuje sytost.

```

Coefficients:
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept) -18.12469    10.12793  -1.790   0.0735 .
RTS3         -0.05204     0.02779  -1.872   0.0612 .
Rrachiev     25.25813    11.85234   2.131   0.0331 *
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

    Null deviance: 240.82  on 247  degrees of freedom
Residual deviance: 233.18  on 245  degrees of freedom
AIC: 239.18

Number of Fisher Scoring iterations: 4

```

Tabulka 15: Výsledky binomického zobecněného lineárního modelu pro výpočet vlivu malárií na barvu peří u samic. Uveden je výsledný nejjednodušší model. Byl nalezen průkazný vliv malárií na sytost barvy a velice slabý vliv na délku pravého rýdovacího pera (RTS3). Získané hodnoty *theta* a *phi* odpovídají tradičnímu viditelnému, resp. UV odstínu, zatímco *r-achieved* vyjadřuje sytost.

```

Wilcoxon signed rank test with continuity correction

data:  Kotrba and Saloun
V = 127, p-value = 0.07225
alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0

```

Tabulka 16: Výsledky Wilcoxonova párového testu pro vyhodnocení rozdílu prevalencí mezi lokalitami Kotrba a Šaloun. Nebyl zjištěn signifikantní rozdíl mezi těmito dvěma lokalitami.

```

Wilcoxon signed rank test with continuity correction

data:  M and F
V = 128, p-value = 0.06618
alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0

```

Tabulka 17: Výsledky Wilcoxonova párového testu pro vyhodnocení rozdílu prevalencí mezi samci a samicemi. Mezi pohlavími nebyl zjištěn signifikantní rozdíl.